

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 115**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01)	C12N 5/10	(2006.01)
A61K 31/337	(2006.01)	C12P 21/08	(2006.01)
A61K 31/475	(2006.01)	A61K 31/439	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)	A61K 31/4545	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)	A61K 31/4745	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)	A61K 31/513	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)	A61K 31/555	(2006.01)
C12N 1/15	(2006.01)	C07K 14/705	(2006.01)
C12N 1/19	(2006.01)	C07K 16/30	(2006.01)
C12N 1/21	(2006.01)	A61K 39/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2011** **E 11836421 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016** **EP 2636736**

54 Título: **Nuevo anticuerpo anti-DR5**

30 Prioridad:

29.10.2010 JP 2010243549

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.06.2016

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku
Tokyo 103-8426, JP**

72 Inventor/es:

**OHTSUKA, TOSHIAKI;
TAKIZAWA, TAKESHI;
OGUNI, AKIKO;
MATSUOKA, TATSUJI;
YOSHIDA, HIROKO y
MATSUI, YUMI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 573 115 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevo anticuerpo anti-DR5

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a un receptor de la superficie celular implicado en la inducción de la apoptosis y que es útil como un agente terapéutico y/o preventivo de tumores y también se refiere a un método de tratamiento y/o prevención del cáncer, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria usando el anticuerpo.

Técnica anterior

10 La apoptosis es un fenómeno esencial en el proceso fisiológico para eliminar células innecesarias o dañadas y mantener el número de células normales *in vivo*. Debido a avances que han aclarado el hecho de que el mecanismo regulador de la apoptosis a menudo está deteriorado en enfermedades cancerosas o inmunitarias y también al esclarecimiento de la ruta reguladora de la apoptosis, el desarrollo de un nuevo inductor de la apoptosis que pueda usarse en el tratamiento del cáncer o de enfermedades inmunitarias ha progresado. En particular, se espera que un anticuerpo, que tiene una afinidad de unión por un ligando por un receptor de la superficie celular implicado en la inducción de la apoptosis, representado por un receptor de muerte o un anticuerpo, que tiene una afinidad de unión por dicho receptor de muerte, tenga un efecto terapéutico sobre estas enfermedades (véase, por ejemplo, el documento 1 no de patente). Se conoce el receptor de muerte 5 (DR5), que es uno de los receptores de muerte algunas veces denominado también KILLER, TRICK 2A, TRAIL-R2, TRICK B o CD262, y una pluralidad de anticuerpos agonistas que inducen la apoptosis en células (véase, por ejemplo, el documento 2 o 3 no de patente o los documentos 1 a 6 de patente). Algunos anticuerpos están desarrollándose actualmente en ensayos clínicos como agentes terapéuticos candidatos y se espera que tengan un efecto terapéutico de tal manera que los anticuerpos actúen específicamente de una manera agonista en las células (células cancerosas o células relacionadas con enfermedades inmunitarias) que expresan el receptor para destruir las células. Para que dicho anticuerpo tenga un efecto antitumoral, es esencial que las células expresen DR5, sin embargo, se ha revelado que no existe correlación entre el efecto y el nivel de expresión de DR5 en un ensayo preclínico (documento 4 no de patente). Se considera que esto es debido a una respuesta celular regulada por muchos factores tales como el nivel de expresión de moléculas de señalización intracelular (tales como caspasa-8 o Bcl-2) implicadas en las rutas de apoptosis (documento 5 no de patente).

Documentos de la técnica anterior

30 [Documento 1 de patente]
WO 98/51793
[Documento 2 de patente]
WO 2001/83560
35 [Documento 3 de patente]
WO 2002/94880
[Documento 4 de patente]
WO 2003/54216
[Documento 5 de patente]
WO 2006/83971
40 [Documento 6 de patente]
WO 2007/22157
[Documento 1 no de patente]
Cell Death and Differentiation, 10: 66-75 (2003)
[Documento 2 no de patente]
45 Journal of Immunology, 162: 2597-2605 (1999)
[Documento 3 no de patente]
Nature Medicine, 7(8): 954-960 (2001)
[Documento 4 no de patente]
Cell Death and Differentiation, 10: 66-75 (2003)
50 [Documento 5 no de patente]
Journal of Clinical Oncology, 26: 3621-3630 (2008)

Sumario de la invención**[Problemas que la invención va a resolver]**

55 Un objeto de la invención es proporcionar un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo para usar como un agente farmacéutico que tenga un efecto terapéutico sobre el cáncer y un polinucleótido que codifique el anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo.

[Medios para resolver los problemas]

Los autores de la presente invención han hecho estudios intensos para conseguir el objeto anterior, y como resultado, descubrieron un anticuerpo que presentaba una fuerte actividad inductora de la apoptosis en las células y por tanto se completaba la invención. También se produjo un efecto terapéutico eficaz en pacientes en los que, con los anticuerpos disponibles en la actualidad, no podía obtenerse un efecto terapéutico suficiente.

Por tanto, la invención incluye las siguientes invenciones.

(1) Un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a DR5, caracterizado porque:

una secuencia de cadena pesada contiene una región variable que tiene CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y la CDRH1 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82, la CDRH2 comprende cualquiera de una de las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NO: 83 y 89, y la CDRH3 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84; y una secuencia de cadena ligera contiene una región variable que tiene CDRL1, CDRL2 y CDRL3, y la CDRL1 comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NO: 79, 85, 86, 87, y 88, la CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80, y la CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 81, o un fragmento funcional del anticuerpo que tiene actividad de unión antigénica.

(2) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (1), caracterizado porque contiene una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 20 y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 16

(3) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (1) o (2), caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

(4) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (3), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 20 y una secuencia de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 16.

(5) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (1), caracterizado porque el anticuerpo está humanizado.

(6) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (5), caracterizado porque contiene:

(a) una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

a1) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 42;

a2) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70;

a3) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95% con una secuencia de aminoácidos seleccionada de a1) y a2);

a4) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 99% con una secuencia de aminoácidos seleccionada de a1) y a2); y

a5) una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución, deleción, o adición de uno a varios restos de aminoácidos en cualquiera de una de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de a1) y a2); y

(b) una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

b1) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28;

b2) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 52;

b3) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 58;

b4) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 62;

b5) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66;

b6) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95% con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de b1) a b5);

b7) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 99% con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de b1) a b5); y

b8) una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución, delección, o adición de uno a varios restos de aminoácidos en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de b1) a b5).

- 5 (7) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (6), caracterizado porque contiene una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 42 y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28.
- 10 (8) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (6), caracterizado porque contiene una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 52.
- 15 (9) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (6), caracterizado porque contiene una secuencia de la región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 58.
- 20 (10) El anticuerpo o un fragmento funcional de anticuerpo de acuerdo con (6), caracterizado porque contiene una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de región variable de cadena ligera variable que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 62.
- 25 (11) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (6), caracterizado porque contiene una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66.
- 30 (12) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (6), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 42 y una secuencia de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28.
- 35 (13) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (6), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 52.
- 40 (14) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (6), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 58.
- 45 (15) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (6), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 62.
- 50 (16) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (6), caracterizado porque contiene una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66.
- (17) El fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de (1) a (16), que se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fab' y Fv.
- 55 (18) Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende al menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de acuerdo con (1) a (17).
- (19) La composición farmacéutica de acuerdo con (18), caracterizada por ser una composición farmacéutica para el tratamiento y prevención del cáncer.
- 60 (20) Una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención del cáncer, caracterizada porque comprende al menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos de acuerdo con (1) a (17) y al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, carboplatino, CPT-11 y vinblastina.
- (21) La composición farmacéutica de acuerdo con (19) o (20), en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer tiroideo, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer uterino, melanoma, glioblastoma y cáncer de células sanguíneas.
- 65 (22) Un anticuerpo o fragmento funcional del mismo que tiene actividad de unión antigénica de acuerdo con una cualquiera de las invenciones (1) a (17) para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer. 19 y una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 15.

(28) El polinucleótido de acuerdo con (26), caracterizado porque contiene una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1413 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 19 y una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 717 de la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 15.

5 (29) El polinucleótido de acuerdo con (26), caracterizado porque contiene:

(a) un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las siguientes secuencias de nucleótidos:

a1) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 41;

10 a2) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69;

a3) una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos seleccionada de a1) y a2) en condiciones rigurosas; y

15 a4) una secuencia de nucleótidos que incluye una sustitución, deleción o adición de uno a varios nucleótidos en una secuencia de nucleótidos seleccionada de a1) y a2); y

(b) un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las siguientes secuencias de nucleótidos:

b1) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 27;

20 b2) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 51;

b3) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 57;

25 b4) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 61;

b5) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 65;

30 b6) una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de b1) a a5) en condiciones rigurosas; y

b7) una secuencia de nucleótidos que incluye una sustitución, deleción o adición de uno a varios nucleótidos en una cualquiera de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de b1) a b5).

(30) El polinucleótido de acuerdo con (29), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 41, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 27.

35 (31) El polinucleótido de acuerdo con (29), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 51.

40 (32) El polinucleótido de acuerdo con (29), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 57.

45 (33) El polinucleótido de acuerdo con (29), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 61.

50 (34) El polinucleótido de acuerdo con (29), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 65.

55 (35) El polinucleótido de acuerdo con (29), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1413 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 41, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 717 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 27.

60 (36) El polinucleótido de acuerdo con (29), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1413 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 717 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 51.

(37) El polinucleótido de acuerdo con (29), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1413 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los

nucleótidos 61 a 717 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 57.

(38) El polinucleótido de acuerdo con (29), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1413 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 717 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 61.

(39) El polinucleótido de acuerdo con (29), caracterizado porque contiene un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1413 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 717 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 65.

(40) Un vector que comprende uno cualquiera de los polinucleótidos de acuerdo con las invenciones (26) a (39).

(41) Una célula hospedadora transformada que comprende uno cualquiera de los polinucleótidos de acuerdo con (26) a (39).

(42) Una célula hospedadora transformada que comprende el vector de acuerdo con (40).

(43) Un método para producir el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las invenciones (2), (4) y (6) a (16), que comprende la etapa de cultivar la célula hospedadora de acuerdo con (41) o (42) y purificar el anticuerpo del producto cultivado resultante.

En el presente documento también se desvela:

(44) Un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, caracterizado porque se une al mismo epítipo que un anticuerpo que contiene una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 20 y una secuencia de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 16.

(45) Un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, caracterizado porque compete con un anticuerpo que contiene una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 20 y una secuencia de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 16.

(46) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (44) o (45), caracterizado porque cuando un fragmento Fab del anticuerpo preparado mediante digestión con papaína, se une a la proteína recombinante representada por SEQ ID NO: 23, se sitúa adyacente al resto de glicina en la posición 26, al resto de isoleucina en la posición 34, al resto de ácido glutámico en la posición 36, al resto de ácido aspártico en la posición 37, al resto de glicina en la posición 38, al resto de ácido aspártico en la posición 56, al resto de leucina en la posición 57, al resto de leucina en la posición 58, al resto de fenilalanina en la posición 59, al resto de leucina en la posición 6, y al resto de arginina en la posición 62 de la proteína recombinante representada por SEQ ID NO: 23 a una distancia de 4 Å o menor.

(47) El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con (46), caracterizado porque la distancia entre cada resto de aminoácido que constituye la proteína recombinante representada por SEQ ID NO: 23 y el fragmento Fab se determina mediante un análisis estructural complejo usando datos de difracción de rayos-X.

Ventaja de la invención

De acuerdo con la invención, puede obtenerse un agente terapéutico para el cáncer, cuyo mecanismo de acción es principalmente a través de la inducción de la apoptosis en las células.

Breve descripción de las figuras

[Fig. 1]

La Fig. 1 es una figura que muestra el efecto citocida de un anticuerpo B273 de ratón.

[Fig. 2]

La Fig. 2 es una figura que muestra actividades de unión de un anticuerpo cB273 y sTRAIL contra una proteína de dominio extracelular de DR5.

[Fig. 3]

La Fig. 3 es una figura que muestra la actividad de unión de un anticuerpo cB273 contra DR5 humano usando Biacore. En la parte superior de la figura, se muestra un gráfico de medición, en el que el eje de las ordenadas representa unidades de resonancia (UR) y el de las abscisas representa el tiempo (segundos). En la parte inferior de la figura, se muestran los valores Kon, Koff, y KD del anticuerpo cB273 calculados usando análisis de programación informática.

[Fig. 4]

La Fig. 4 es una figura que muestra el efecto citocida *in vitro* de un anticuerpo cB273 en líneas celulares de cáncer humano. A) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de ovario humano, B) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de colon humano, C) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de pulmón humano y D) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de mama humano.

[Fig. 5]

La Fig. 5 es una figura que muestra el efecto citocida *in vitro* de un anticuerpo cB273 en líneas celulares de cáncer humano. A) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de páncreas humano, B) muestra los resultados de una línea celular de melanoma humano, C) muestra los resultados de una línea celular de

glioblastoma humano y D) muestra los resultados de una línea celular de cáncer endometrial humano.

[Fig. 6]

La Fig. 6 es una vista que muestra una estructura del complejo DR5-cB273 Fab.

[Fig. 7]

5 La Fig. 7 es una vista que muestra la interacción entre DR5 y la cadena H o L de cB273 Fab. A) es una vista que ilustra los restos de aminoácidos de la cadena H de cB273 Fab que se sitúa a una distancia de 4 Å o menor de DR5 y viceversa como un modelo de barra. Ile34, Glu36, Asp37, Gly38, Asp56, Leu57, Leu58, Phe59, Leu61 y Arg62 mostrados en el lado izquierdo del dibujo son restos de aminoácidos procedentes de DR5 y los números de restos de aminoácidos respectivos corresponden a los de las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NO: 23 en el Listado de Secuencias. Además, Phe33, Arg50, Asn52, Tyr54, Asn55, Phe59, Tyr101, Tyr102, Phe103 y Asp104 en el lado derecho del dibujo son restos de aminoácidos procedentes de la cadena pesada de cB273, y los números de restos de aminoácidos respectivos se proporcionan usando un resto de ácido glutámico en la posición 20 de la SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias como un punto de partida. B) es una vista que ilustra restos de aminoácidos de la cadena L de cB273 Fab que se sitúa a una distancia de 4 Å o menor de DR5 y viceversa con algunos como un modelo de barra y otros como un modelo de cinta. Gly26, Glu36, Asp37, y Gly38 del lado izquierdo del dibujo son restos de aminoácidos procedentes de DR5, y los números de restos de aminoácidos respectivos corresponden a los de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 23 en el Listado de Secuencias. Además, His31, Asn33, Val99, y Trp101 en el lado derecho del dibujo son restos de aminoácidos procedentes de la cadena ligera de cB273, y los números de restos de aminoácidos respectivos se proporcionan usando un resto de ácido aspártico en la posición 21 de la SEC ID NO: 16 en el Listado de Secuencias como un punto de partida. Los restos de aminoácidos de DR5 que se encuentran a una distancia de 4 Å o menor desde el fragmento Fab de cB273 son un resto de glicina en la posición 26, un resto de isoleucina en la posición 34, un resto de ácido glutámico en la posición 36, un resto de ácido aspártico en la posición 37, un resto de glicina en la posición 38, un resto de ácido aspártico en la posición 56, un resto de leucina en la posición 57, un resto de leucina en la posición 58, un resto de fenil alanina en la posición 59, un resto de leucina en la posición 61 y un resto de arginina en la posición 62 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 23 en el Listado de secuencias.

[Fig. 8-1]

30 La Fig. 8-1 es una figura que muestra la actividad de unión de anticuerpos hB273 con DR5 humano usando Biacore, y muestra gráficos de medición para los anticuerpos respectivos.

[Fig. 8-2]

35 La Fig. 8-2 es una tabla que muestra la actividad de unión de anticuerpos hB273 con DR5 humano usando Biacore, y muestra los valores de Kon, Koff, y KD de los anticuerpos respectivos calculados usando análisis de programación informática. Por otro lado, el número dado en cada gráfico en la Fig. 8-1 corresponde al N° de entrada de la tabla de la Fig. 8-2.

[Fig. 9]

40 La Fig. 9 es una figura que muestra la actividad citocida *in vitro* de anticuerpos hB273 contra células Jurkat, que son una línea celular procedente del linfoma T humano.

[Fig. 10-1]

40 La Fig. 10-1 es una figura que muestra la actividad de unión de anticuerpos hB273 con DR5 humano usando Biacore, y muestra gráficos de medición de los anticuerpos respectivos.

[Fig. 10-2]

45 La Fig. 10-2 es una tabla que muestra la actividad de unión de anticuerpos hB273 con DR5 humano usando Biacore, y muestra los valores Kon, Koff, y KD de los anticuerpos respectivos calculados usando análisis de programación informática. Por otro lado, el número dado en cada gráfico en la Fig. 10-1 corresponde al N° de entrada de la tabla de la Fig. 10-2.

[Fig. 11]

50 La Fig. 11 es una figura que muestra la actividad citocida *in vitro* de anticuerpos hB273 contra células Jurkat que son una línea celular procedente de linfoma T humano.

[Fig. 12-1]

50 La Fig. 12-1 es una vista que muestra la actividad de unión de anticuerpos hB273 con CDR modificada contra DR5 humano usando Biacore, y muestra gráficos de medición de los anticuerpos respectivos.

[Fig. 12-2]

55 La Fig. 12-2 es una tabla que muestra la actividad de unión de anticuerpos hB273 con CDR modificada contra DR5 humano usando Biacore y muestra los valores Kon, Koff y KD de los anticuerpos respectivos calculados usando análisis de programación informática. Por otro lado, el número dado en cada gráfico en la Fig. 12-1 corresponde al N° de entrada de la tabla de la Figura 12-2.

[Fig. 13-1]

60 La Fig. 13-1 es una figura que muestra la evaluación de la estabilidad térmica de anticuerpos hB273 con CDR modifica usando calorimetría diferencial de barrido (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) y muestra gráficos de medición de los anticuerpos respectivos.

[Fig. 13-2]

65 La Fig. 13-2 es una figura que muestra la evaluación de la estabilidad térmica de anticuerpos hB273 con CDR modificada usando calorimetría diferencial de barrido (DSC) y muestra gráficos de medición de los anticuerpos respectivos.

[Fig. 13-3]

La Fig. 13-3 muestra valores T_m de los anticuerpos respectivos calculados a partir de los gráficos mostrados en las Figs. 13-1 y 13-2. Dicho sea de paso, el número dado en cada gráfico en las Figs. 13-1 y 13-2 corresponde al N° de entrada de la Figura 13-3.

[Fig. 14]

5 La Fig. 14 es una figura que muestra las actividades citocidas *in vitro* de anticuerpos hB273 con CDR modificada contra células Jurkat que son una línea celular procedente de linfoma T humano.

[Fig. 15]

10 La Fig. 15 es una vista que muestra el efecto de activación de caspasa-3/7 en la actividad citocida *in vitro* de un anticuerpo hB273_H2-1-NE/L1-NK en líneas celulares de cáncer humano. A) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 y B) muestra los resultados de una línea celular de glioblastoma humano U-87MG.

[Fig. 16]

15 La Fig. 16 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de colon humano COLO 205 implantada.

[Fig. 17]

La Fig. 17 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de páncreas humano MIAPaCa-2 implantada.

[Fig. 18]

20 La Fig. 18 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de glioblastoma humano U-87MG implantada.

[Fig. 19]

25 La Fig. 19 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de células de cáncer de pulmón humano NCI-H2122 implantada (en combinación con paclitaxel y carboplatino).

[Fig. 20]

La Fig. 20 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de pulmón humano NCI-H460 implantada (en combinación con paclitaxel y carboplatino).

[Fig. 21]

30 La Fig. 21 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de colon humano DLD-1 implantada (en combinación con CPT-11).

[Fig. 22]

35 La Fig. 22 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 implantada (en combinación con CPT-11).

[Fig. 23]

La Fig. 23 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de colon humano HCT-116 implantada (en combinación con CPT-11).

[Fig. 24]

40 La Fig. 24 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo cB273 en ratones desnudos con una línea celular de melanoma humano A375 implantada (en combinación con vinblastina).

[Fig. 25]

45 La Fig. 25 es una figura que muestra una comparación de la actividad antitumoral *in vivo* en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 implantada entre un anticuerpo cB273 y conatumumab.

[Fig. 26]

La Fig. 26 es una figura que muestra una comparación de la actividad antitumoral *in vivo* en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de pulmón humano NCI-H1975 implantada entre un anticuerpo cB273 y conatumumab.

[Fig. 27]

50 La Fig. 27 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo hB273_H2-1-NE/L1-NK (indicado como "hB273" en el dibujo) en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de colon humano COLO 205 implantada.

[Fig. 28]

55 La Fig. 28 es una figura que muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica una cadena pesada del anticuerpo B273 de ratón y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo B273 de ratón.

[Fig. 29]

La Fig. 29 es una figura que muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica una cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón.

[Fig. 30]

60 La Fig. 30 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo quimera de B273 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo quimera de B273.

[Fig. 31]

La Fig. 31 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo quimera de B273 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo quimera de B273.

[Fig. 32]

65 La Fig. 32 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo

hB273_L1 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1.

[Fig. 33]

La Fig. 33 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hB273_L2 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L2.

5 [Fig. 34]

La Fig. 34 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hB273_L3 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L3.

[Fig. 35]

10 La Fig. 35 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H1 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H1.

[Fig. 36]

La Fig. 36 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H2 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2.

[Fig. 37]

15 La Fig. 37 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H3 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H3.

[Fig. 38]

La Fig. 38 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H1-1 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H1-1.

20 [Fig. 39]

La Fig. 39 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H2-1 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-1.

[Fig. 40]

25 La Fig. 40 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H2-2 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-2.

[Fig. 41]

La Fig. 41 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H2-3 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-3.

[Fig. 42]

30 La Fig. 42 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H2-4 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-4.

[Fig. 43]

La Fig. 43 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H2-5 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-5.

35 [Fig. 44]

La Fig. 44 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hB273_L1-NE y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NE.

[Fig. 45]

40 La Fig. 45 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hB273_L1-NF y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NF.

[Fig. 46]

La Fig. 46 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hB273_L1-NK y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NK.

[Fig. 47]

45 La Fig. 47 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hB273_L1-NL y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NL.

[Fig. 48]

La Fig. 48 es una figura que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hB273_H2-1-NE y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-1-NE.

50 [Fig. 49]

La Fig. 49 es una figura que muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica una cadena ligera de conatumumab y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de conatumumab.

[Fig. 50]

55 La Fig. 50 es una figura que muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica una cadena pesada de conatumumab y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de conatumumab.

[Fig. 51]

60 La Fig. 51 es una figura que muestra la actividad citocida *in vitro* de un anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK contra líneas celulares de cáncer humano A) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de estómago humano, B) muestra los resultados de una línea celular de cáncer renal humano, C) muestra los resultados de una línea celular de cáncer de hígado humano y D) muestra los resultados de una línea celular de fibrosarcoma humano.

[Fig. 52]

65 La Fig. 52 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK (indicado como "hB273" en el dibujo) en combinación con 5-FU en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 implantada y una comparación de la actividad con conatumumab.

[Fig. 53]

La Fig. 53 es una figura que muestra la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK (indicado como "hB273" en el dibujo) en combinación con paclitaxel en ratones desnudos con una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano NCI-H1975 implantada y una comparación de la actividad con conatumumab

[Modo de realizar la invención]

Los términos "cáncer" y "tumor" como se usan en el presente documento se usan con el mismo significado.

El término "gen" como se usa en el presente documento incluye no sólo ADN, sino también ARNm del mismo, ADNc y ARNc del mismo.

10 El término "polinucleótido" como se usa en el presente documento se usa con el mismo significado que "ácido nucleico" y también incluye ADN, ARN, sondas, oligonucleótidos y cebadores.

Los términos "polipéptido" y "proteína" como se usan en el presente documento se usan sin distinción.

La expresión "fracción de ARN", como se usa en el presente documento se refiere a una fracción que contiene ARN.

15 El término "célula" como se usa en el presente documento también incluye células en un individuo animal y células cultivadas.

El término "transformación maligna de células", como se usa en el presente documento, se refiere a un estado en el que las células muestran proliferación anómala, por ejemplo, células que pierden su sensibilidad al ponerse en contacto con un fenómeno de inhibición, células que muestran proliferación independiente de anclaje, y etcétera, y las células que muestran dicha proliferación anómala se denominan "células cancerosas".

20 La expresión "lesión celular", como se usa en el presente documento, se refiere a un estado en el que se produce un cambio patológico en las células, en una forma de algún tipo y la lesión celular no está limitada a lesión directa, e incluye todos los tipos de daños en la estructura y función de las células, tal como escisión de ADN, formación de bases-dímeros, escisión cromosómica, daño en la máquina de la división celular y una disminución en diversas actividades enzimáticas.

25 La expresión "actividad citotóxica" como se usa en el presente documento se refiere a una actividad de causa de la lesión celular descrita anteriormente.

30 La expresión "receptor que contiene un dominio de muerte" (que incluye Fas, TNFRI, DR3, DR4, DR5, y DR6, aunque sin limitarse a los mismos) como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula receptora que tiene una región de transducción de señal apoptótica denominada "dominio de muerte" que muestra homología con el gen suicida *reaper* (segador) de *Drosophila* en un dominio intracelular.

35 La expresión "fragmento funcional de un anticuerpo" como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento parcial de un anticuerpo que tiene actividad de unión antigénica e incluye Fab, F(ab')₂ y scFv. El término también incluye Fab' que es un fragmento monovalente en una región variable de un anticuerpo obtenida por tratamiento de F(ab')₂ en condiciones reductoras. Sin embargo, la expresión no está limitada a estas moléculas siempre que el fragmento tenga una afinidad de unión por un antígeno. Adicionalmente, estos fragmentos funcionales no solo incluyen un fragmento obtenido por tratamiento de una molécula de longitud completa de una proteína de anticuerpo con una enzima apropiada, sino también una proteína producida en una célula hospedadora apropiada usando un gen de anticuerpo modificado genéticamente.

40 El término "Fab" como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento monovalente en una región variable de un anticuerpo obtenida tratando F(ab')₂ en condiciones reductoras como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, el Fab' producido usando un gen de anticuerpo modificado genéticamente también se incluye dentro del Fab' de la invención.

La expresión "anticuerpo de fragmento variable monocatenario" como se usa en el presente documento se usa con el mismo significado que un Fv monocatenario (scFv, *single chain* Fv).

45 El término "epítipo" como se usa en el presente documento se refiere a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial de un antígeno al cual se une un anticuerpo específico. El epítipo que es un péptido parcial de un antígeno puede determinarse por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tal como un inmunoensayo, y por ejemplo, puede emplearse el siguiente método. En primer lugar, se producen diversas estructuras parciales de un antígeno. En la producción de las estructuras parciales, puede usarse una técnica de síntesis de oligopéptidos conocida. Por ejemplo, se produce una serie de polipéptidos que tienen longitudes apropiadamente reducidas obtenidas acortando secuencialmente el antígeno del extremo C o del extremo N, usando una técnica de recombinación genética conocida por los expertos en la técnica. Después de esto, se examina la reactividad de un anticuerpo contra estos polipéptidos y en líneas generales se determina un sitio de reconocimiento. Después, los péptidos que tienen longitudes más cortas se sintetizan y se examina la reactividad con estos péptidos, mediante lo

50

cual el epítopo puede determinarse. Adicionalmente, el epítopo que es una estructura terciaria parcial de una unión antigénica con un anticuerpo específico puede determinarse por especificación de los restos de aminoácidos del antígeno que se sitúa adyacente al anticuerpo mediante análisis estructural de rayos X.

5 La expresión “anticuerpos que se unen al mismo epítopo” como se usa en el presente documento se refiere a diferentes anticuerpos que se unen a un epítopo común. Si un segundo anticuerpo se une a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial a la cual se une un primer anticuerpo, puede determinarse que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítopo. Además, confirmando que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo por la unión con un antígeno (es decir, el segundo anticuerpo inhibe la unión entre el primer anticuerpo y el antígeno), puede determinarse en el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítopo incluso si la secuencia o estructura epitópica específica no se ha determinado. Además, cuando el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítopo y también el primer anticuerpo tiene un efecto especial tal como una actividad inductora de la apoptosis, puede esperarse que el segundo anticuerpo tenga también la misma actividad.

15 El término “CDR” como se usa en el presente documento se refiere a una región determinante de la complementariedad (CDR), y se sabe que cada cadena pesada y ligera de una molécula de anticuerpo tiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR). La CDR también se denomina dominio hipervariable, y está presente en una región variable de cada cadena pesada y ligera de un anticuerpo. Se trata de un sitio que tiene inusualmente alta variabilidad en su estructura primaria y hay tres CDR distintas en la estructura primaria de cada cadena polipeptídica pesada y ligera. En esta memoria descriptiva, al igual que para las CDR de un anticuerpo, las CDR de la cadena pesada se representan por CDRH1, CDRH2 y CDRH3 desde el lado amino terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, y las CDR de la cadena ligera se representan por CDRL1, CDRL2 y CDRL3 desde el lado amino terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera. Estos sitios están próximos entre sí en la estructura terciaria y determinan la especificidad por un antígeno al cual se une el anticuerpo.

25 La expresión “anticuerpo secundario” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a una molécula de anticuerpo, entrecruzándose de este modo las moléculas de anticuerpo.

30 La frase “la hibridación se realiza en condiciones rigurosas” como se usa en el presente documento se refiere a un proceso en el la hibridación se realiza en condiciones en las que la identificación puede efectuarse realizando la hibridación a 68 °C en una solución de hibridación disponible en el comercio, la solución de hibridación ExpressHyb (fabricada por Clontech, Inc.) o realizando la hibridación a 68 °C en presencia de NaCl de 0,7 a 1,0 M, usando un filtro que tenga ADN inmovilizado en su interior, seguido por un lavado a 68 °C usando una solución de 0,1 a 2 x SSC (la solución 1 x SSC está compuesta por NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM) o en condiciones equivalentes a las mismas.

35 La expresión “varios aminoácidos” en la descripción de “una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución, delección o adición de uno a varios aminoácidos” como se usa en el presente documento se refiere a un número arbitrario de restos de aminoácidos seleccionados de 2 a 10. Más específicamente, cuando se sustituyen, se delecionan o se añaden 10 o menos aminoácidos, de 5 a 6 o menos aminoácidos, o de 2 a 3 o menos aminoácidos, se usa la descripción de “una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución, delección o adición de diversos aminoácidos”.

40 La descripción de, por ejemplo, “una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la SEQ ID NO: 34” como se usa en el presente documento se usa con el mismo significado que la descripción de “una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la SEQ ID NO: 34”. Además, la descripción de, por ejemplo, “una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 34” se usa con el mismo significado que la descripción de “una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 34”.

1. Relaciones de genes relacionados con la apoptosis

50 Se requiere un anticuerpo de acuerdo con la invención para unirse a un antígeno específico y exhibir una actividad citotóxica mediante el antígeno. Además, para impedir que las células normales se destruyan, es necesario seleccionar el antígeno específicamente presente en células tumorales. Un ejemplo de dicho grupo antigénico puede incluir grupos receptores de ligando inductor de la apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (en lo sucesivo denominado “TNF” en la memoria descriptiva) (en lo sucesivo denominado “TRAIL” en la memoria descriptiva). TRAIL es un miembro de la familia de proteínas de TNF e incluye ligandos Fas y TNF- α (Wiley SR, y col., Immunity 1995 diciembre; 3 (6): 673-82). Estas proteínas son fuertes factores inductores de la apoptosis.

55 Los receptores de esta familia de proteínas de TNF se caracterizan por secuencias repetidas ricas en cisteína en el dominio extracelular. Entre estos, Fas que es un receptor para ligandos Fas, y el receptor I de TNF (en lo sucesivo, denominado “TNFRI” en la memoria descriptiva) que es un receptor de TNF α , tienen en un dominio intracelular, una región esencial para la transducción de señal apoptótica, denominado “dominio de muerte”, que es una región que muestra homología con el gen suicida *reaper* de *Drosophila* (Golstein, P., y col., (1995) Cell. 81, 185-186; y White, K,

y col., (1994) Science 264, 677-683) y en su conjunto se denominan receptores que contienen el dominio de muerte.

Se han identificado cinco receptores para TRAIL, entre estos, dos receptores (DR4 (TRAIL-R1) y DR5 (TRAIL-R2)) tienen la capacidad de transducir una señal apoptótica y los otros tres receptores (DcR1 (TRAIL -R3), DcR2 (TRAIL-R4) y la osteoprotegerina (OPG)) no transducen ninguna señal apoptótica. De manera similar a Fas y a TNFRI, tanto DR4 como DR5 incluyen un dominio de muerte en un segmento intracelular y transducen una señal apoptótica mediante una ruta que contiene una proteína del dominio de muerte asociado a Fas (en lo sucesivo denominado "FADD" en la memoria descriptiva) y caspasa 8 (Chaudhary PM, y col., Immunity 1997 diciembre; 7 (6): 813-20; y Schneider P, y col. Immunity 1997 diciembre; 7 (6): 821-30). Se sabe que, para Fas, TNFRI, DR4 o DR5 descritos anteriormente, un anticuerpo que se une a cualquiera de estas moléculas y funciona como un agonista, exhibe una actividad inductora de apoptosis contra células portadoras de la molécula en la superficie celular (Journal of Cellular Physiology, 209: 1221-1028 (2006); Leukemia, Apl; 21 (4): 805-812 (2007); Blood, 99: 1666-1675 (2002); y Cellular Immunology, Jan; 153 (1): 184-193 (1994)). El efecto farmacológico del anticuerpo agonista descrito anteriormente se potencia entrecruzándose con un anticuerpo secundario o una célula efectora (Journal of Immunology, 149: 3166-3173 (1992); and European Journal of Immunology, octubre; 23 (10): 2676-2681 (1993)).

La secuencia de nucleótidos de un gen DR5 (receptor 5 de muerte) humano y su secuencia de aminoácidos se han registrado como GI: 22547118 (nº de registro: NM_147187) en el GenBank. Por otro lado, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución, delección o adición de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de DR5, y que también tiene una actividad biológica equivalente a la de DR5, también se incluye dentro del significado de la expresión "secuencia de nucleótidos del gen DR5". Además, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución, delección o adición de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de DR5 y que también tiene actividad biológica equivalente a la de DR5, también se incluye dentro del significado del término "DR5".

2. Producción del anticuerpo anti-DR5

El anticuerpo contra DR5 de la invención y como se desvela en el presente documento, puede obtenerse inmunizando a un animal con DR5 o con un polipéptido arbitrario seleccionado de la secuencia de aminoácidos de DR5 y recogiendo y purificando el anticuerpo producido *in vivo* de acuerdo con un procedimiento habitual. La especie biológica de DR5 a usar como un antígeno no está limitada a la especie humana, y puede inmunizarse a un animal con un DR5 procedente de un animal que no sea un ser humano, tal como un ratón o una rata. En este caso, examinando la reactividad cruzada entre un anticuerpo que se une al DR5 heterólogo obtenido y el DR5 humano, puede seleccionarse un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

Adicionalmente, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal fusionando células productoras de anticuerpo, que producen un anticuerpo contra DR5, con células de mieloma para establecer un hibridoma de acuerdo con un procedimiento conocido (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature, (1975) 256, págs. 495-497, Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, págs. 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)).

Por otro lado, el DR5 a usar como un antígeno puede obtenerse a través de modificación por ingeniería genética para hacer que una célula hospedadora exprese un gen de DR5.

Específicamente, se produce un vector con capacidad para expresar un gen de DR5, y el vector resultante se transfecta en una célula hospedadora para expresar el gen, y después el gen de DR5 expresado se purifica. En lo sucesivo en el presente documento, se describirá específicamente un procedimiento de obtención de un anticuerpo contra DR5.

(1) Preparación de antígeno

Los ejemplos del antígeno a usar para la producción del anticuerpo anti-DR5 incluyen DR5, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos parcial que contiene al menos 6 aminoácidos consecutivos de DR5, y un derivado obtenido añadiendo una secuencia de aminoácidos dada o un transportador de la misma.

DR5 puede purificarse directamente de tejidos tumorales humanos o de células tumorales humanas y usarse. Además, DR5 puede obtenerse sintetizándolo *in vitro* o haciendo que lo produzca una célula hospedadora a través de modificación por ingeniería genética.

Con respecto a la modificación por ingeniería genética, específicamente, el ADNc de DR5 se integra en un vector con capacidad de expresar ADNc de DR5 y DR5 se sintetiza en una solución que contiene una enzima, un sustrato y una sustancia energética requerida para la transcripción y traducción, u otra célula hospedadora procarionota o eucariota se transforma para expresar DR5, por lo cual puede obtenerse el antígeno.

Adicionalmente, el antígeno también puede obtenerse como una proteína secretora, expresando una proteína de fusión obtenida uniendo el dominio extracelular de DR5, que es una proteína de membrana, con la región constante de un anticuerpo en un sistema de hospedador-vector apropiado.

El ADNc de DR5 puede obtenerse, por ejemplo, a través del procedimiento denominado de PCR en el que se realiza una reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo en el presente documento "PCR") usando una biblioteca de ADNc que, como molde, contiene ADNc de DR5 y cebadores que amplifican específicamente el ADNc de DR5 (véase Saiki, RK, y col., Science, (1988) 239, págs. 487-489).

- 5 En cuanto al sistema para la síntesis *in vitro* del polipéptido, puede servir de ejemplo, pero sin limitación, el sistema de traducción rápida (RTS) fabricado por Roche Diagnostics, Inc.

Los ejemplos de células hospedadoras procariotas incluyen *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Para transformar la célula hospedadora con un gen diana, la célula hospedadora se transforma usando un vector plasmídico que contiene un replicón, es decir, un origen de replicación procedente de una especie compatible con el hospedador y una secuencia reguladora. Además, el vector tiene preferentemente una secuencia con capacidad de imponer selectividad fenotípica en la célula transformada.

Los ejemplos de células hospedadoras eucariotas incluyen, células de vertebrado, células de insecto y células de levadura. En cuanto a células de vertebrado, con frecuencia se utilizan, por ejemplo, cepas con déficit de dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, págs. 4126-4220) de células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, págs. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos NIH3T3 murinos (ATCC n.º CRL-1658) y células de ovario de hámster chino (células CHO; ATCC: CCL-61), sin embargo, no están limitadas a las mismas.

El transformante así obtenido puede cultivarse de acuerdo con un procedimiento habitual, y a través del cultivo del transformante, se produce un polipéptido diana de manera intracelular o extracelular.

- 20 Para el cultivo puede utilizarse un medio adecuado que, dependiendo de la célula hospedadora empleada, puede seleccionarse de los diversos medios de cultivo habitualmente utilizados. Si se emplea *Escherichia coli*, por ejemplo, puede usarse medio LB complementado con un antibiótico tal como ampicilina o IPMG si fuera necesario.

Una proteína recombinante producida de manera intracelular o extracelular por el transformante a través de dicho cultivo puede separarse y purificarse a través de cualquiera de los diversos procedimientos de separación conocidos utilizando una propiedad física o química característica de la proteína.

Los ejemplos específicos de los procedimientos incluyen el tratamiento con un precipitante de proteínas habitual, ultrafiltración, diversos tipos de cromatografía líquida, tal como cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad, diálisis y una combinación de las mismas.

- 30 Adicionalmente, fijando una etiqueta de seis restos de histidina a la proteína recombinante a expresar, la proteína puede purificarse de un modo eficaz con una columna de afinidad de níquel. Como alternativa, fijando una región Fc de IgG a una proteína recombinante a expresar, la proteína puede purificarse de un modo eficaz con una columna de proteína A.

35 Combinando los procedimientos descritos anteriormente, puede producirse fácilmente una gran cantidad de un polipéptido diana a alto rendimiento y con una pureza elevada.

(2) Producción de anticuerpos monoclonales anti-DR5

Los ejemplos de anticuerpos que se unen específicamente a DR5 incluyen un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a DR5 y un procedimiento de obtención del anticuerpo es como se describe más adelante.

La producción de un anticuerpo monoclonal generalmente requiere las siguientes etapas operativas de:

- 40 (a) purificación de un biopolímero a usar como un antígeno;
 (b) preparación de células productoras de anticuerpos inmunizando a un animal a través de inyección del antígeno, recogida de la sangre y ensayo del título de sus anticuerpos para determinar cuándo extraer el bazo;
 (c) preparación de células de mieloma (en lo sucesivo en el presente documento denominada "mieloma");
 (d) fusión de las células productoras de anticuerpo con el mieloma;
 45 (e) exploración de un grupo de hibridomas productores de un anticuerpo diana;
 (f) división de los hibridomas en clones celulares sencillos (clonación);
 (g) opcionalmente, cultivar el hibridoma o criar un animal al cual se le ha implantado el hibridoma, para producir una gran cantidad de un anticuerpo monoclonal;
 (h) examinar la actividad biológica y especificidad de unión del anticuerpo monoclonal así producido, o someter a
 50 ensayo las propiedades del mismo como un reactivo marcado.

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá con detalle el procedimiento de producción de un anticuerpo monoclonal siguiendo las etapas anteriores, sin embargo, el procedimiento no está limitado a estas y, por ejemplo, pueden usarse células productoras de anticuerpos que no sean esplenocitos ni mieloma.

(a) Purificación del antígeno

Como antígeno puede usarse un DR5 preparado por el procedimiento descrito anteriormente o un péptido parcial del mismo.

Además, como antígeno también puede usarse una fracción de membrana preparada a partir de células recombinantes que expresan DR5 o de las células recombinantes que en sí mismas expresan DR5, y también a partir de un péptido parcial de la proteína de la invención sintetizado químicamente a través de un procedimiento conocido por los expertos en la técnica.

(b) Preparación de células productoras de anticuerpos

El antígeno obtenido en la etapa (a) se mezcla con un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, con o sulfato de aluminio y fosfato y la mezcla resultante se usa como un inmunógeno para inmunizar a un animal experimental. Como animal experimental, puede utilizarse sin problemas cualquier animal utilizado en un procedimiento de producción de hibridoma. Específicamente, puede utilizarse, por ejemplo, un ratón, una rata, una oveja, una cabra, una vaca, un caballo, o similares. Sin embargo, desde el punto de vista de facilitar la existencia de células de mieloma para fusionar con las células productoras de anticuerpos extraídas, como animal a inmunizar se utiliza preferentemente un ratón o una rata.

Además, la cepa de ratón o rata a usar no está particularmente limitada, y en el caso de un ratón, por ejemplo, pueden utilizarse diversas cepas tales como A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB y 129 y en el caso de una rata, por ejemplo, pueden utilizarse las cepas Wistar, Low, Lewis, Sprague Dawley, ACI, BN, Fischer y similares.

Entre estas, teniendo en cuenta la compatibilidad de la fusión con las células de mieloma, como se describe más adelante, como animal para inmunizar, en el caso de un ratón, particularmente se prefiere una cepa BALB/c y en el caso de una rata, se prefieren las cepas Wistar y Low.

Además, teniendo en cuenta la homología antigénica entre seres humanos y ratones, también se prefiere el uso de un ratón que tenga una función biológica disminuida para eliminar los autoanticuerpos, es decir, un ratón con una enfermedad autoinmunitaria.

La edad del ratón o de la rata en el momento de la inmunización es, preferentemente, de 5 a 12 semanas de vida, más preferentemente de 6 a 8 semanas de vida.

Para inmunizar a un animal con DR5 o con una proteína recombinante del mismo, puede utilizarse, por ejemplo, un procedimiento conocido descrito con detalle, por ejemplo, en Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochimistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) o similar.

Las células productoras de anticuerpos, incluyendo, esplenocitos o linfocitos, se eliminan asépticamente del animal inmunizado. En este momento, el título del anticuerpo se mide, y si un animal tiene un título de anticuerpo suficientemente aumentado, se usa como una fuente de suministro de las células productoras de anticuerpos, pudiendo efectuarse el procedimiento posterior de un modo más eficaz.

Los ejemplos del procedimiento de medición del título de anticuerpo a usar en el presente documento incluyen un procedimiento RIA y un procedimiento ELISA, pero el procedimiento no está limitado a estos.

La separación de las células productoras de anticuerpos de los esplenocitos o linfocitos del animal inmunizado puede realizarse de acuerdo con un procedimiento conocido (por ejemplo, Kohler y col., Nature (1975), 256, pág. 495; Kohler y col., Eur. J. Immunol. (1977), 6, pág. 511; Milstein y col., Nature (1977), 266, pág. 550; Walsh, Nature (1977), 266, pág. 495).

(c) Células de mieloma (en lo sucesivo en el presente documento denominado "mieloma")

Las células de mieloma a usar para la fusión celular no están particularmente limitadas y pueden seleccionarse células adecuadas de líneas celulares conocidas. Sin embargo, teniendo en cuenta la comodidad cuando se selecciona un hibridoma de células fusionadas, se prefiere el uso de una cepa con déficit de HGPRT (hipoxantina guanina fosforribosil transferasa) cuyo procedimiento de selección se ha establecido.

Más específicamente, como ejemplos de cepas con déficit de HGPRT se incluyen X63-Ag8 (X63), NS1-ANS/1 (NS1), P3X63-Ag8.U1 (P3U1), X63-Ag8.653 (X63.653), SP2/0-Ag14 (SP2/0), MPC11-45.6TG1.7 (45.6G), F0, S149/5XXO, y BU.1 procedentes de ratones; 210.RSY3.Ag.1.2.3 (Y3) procedente de ratas; y U266AR (SKO-007), GM1500-GTG-A12 (GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2 (HMy2) y 8226AR/NIP4-1 (NP41) procedentes de seres humanos.

(d) Fusión celular

La fusión entre las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma puede realizarse apropiadamente de acuerdo con un procedimiento conocido (Weir, D. M. Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell

Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. y Mayer, M. M., *Experimental Immunochemistry*, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), etc.) en condiciones tales que el índice de supervivencia de las células no esté excesivamente reducido.

5 Como un procedimiento de este tipo, puede utilizarse, por ejemplo, un procedimiento químico en el que las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma se mezclan en una solución que contiene un polímero, tal como polietilenglicol a una alta concentración, un procedimiento físico usando estimulación eléctrica, o similar.

(e) Selección de un grupo de hibridomas

10 El procedimiento de selección de hibridomas obtenidos a través de la fusión celular descrita anteriormente, no está particularmente limitado. Normalmente, se usa el método de selección con HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) (Kohler y col., *Nature* (1975), 256, pág. 495; Milstein y col., *Nature* (1977), 266, pág. 550).

Este procedimiento es efectivo cuando se obtienen hibridomas usando las células de mieloma de una cepa con déficit de HGPRT que no puede sobrevivir en presencia de aminopterina.

Esto es, cultivando células e hibridomas no fusionados en medio HAT, solo sobreviven y proliferan de un modo selectivo hibridomas resistentes a aminopterina.

15 (f) División en clones de una sola célula (clonación)

20 Como un procedimiento de clonación para hibridomas, puede utilizarse un procedimiento conocido tal como un procedimiento con metilcelulosa, un procedimiento con agarosa blanda o un procedimiento de dilución limitante (véase, por ejemplo, Barbara, B. M. y Stanley, M. S.: *Selected Methods in Cellular Immunology*, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Entre estos procedimientos, particularmente, se prefiere un procedimiento de cultivo tridimensional, tal como un procedimiento con metilcelulosa. Por ejemplo, el grupo de hibridomas producido por fusión celular se suspende en un medio con metilcelulosa, tal como Medio de Selección D de ClonaCell-HY (fabricado por StemCell Technologies, inc., n.º 03804) y se cultiva. Después, las colonias de hibridoma formadas se recogen, obteniéndose de este modo hibridomas monoclonales. Las colonias de hibridoma respectivas recogidas se cultivan, y un hibridoma que se ha confirmado que tiene un título de anticuerpo estable en un sobrenadante de cultivo de hibridoma obtenido se selecciona como una cepa de hibridoma productora de anticuerpos monoclonales DR5.

30 Los ejemplos de la cepa de hibridoma establecida de este modo incluyen el hibridoma B273 de DR5. Por otro lado, en esta memoria descriptiva, un anticuerpo producido por el hibridoma B273 se denomina "anticuerpo B273" o simplemente "B273". La cadena pesada del anticuerpo B273 tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 en el Listado de Secuencias. Además, la cadena ligera del anticuerpo B273 tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 10 en el Listado de Secuencias. Por otro lado, en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 8 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1 a 19 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 es una región variable y una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 142 a 465 es una región constante. Además, en la secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 10 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1 a 19 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 133 es una región variable y una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 134 a 238 es una región constante.

40 La secuencia de aminoácidos de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 8 en el Listado de Secuencias está codificada por una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 7 en el Listado de Secuencias. En la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 7 en el Listado de Secuencias, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 1 a 57 codifica la secuencia señal de cadena pesada del anticuerpo, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo y una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 424 a 1395 codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo.

50 La secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 10 en el Listado de Secuencias está codificada por una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 9 en el Listado de Secuencias. En la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 9 en el Listado de Secuencias, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 1 a 57 codifica la secuencia señal de cadena ligera del anticuerpo, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 399 codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo y una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 400 a 714 codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo.

(g) Preparación del anticuerpo monoclonal a través de cultivo de hibridoma

55 Cultivando el hibridoma así seleccionado, puede obtenerse de un modo eficaz un anticuerpo monoclonal. Sin embargo, antes de cultivar, se prefiere realizar la exploración de un hibridoma que produzca un anticuerpo

monoclonal diana.

En dicha exploración, puede emplearse un procedimiento conocido.

La medición del título de anticuerpo en la invención puede realizarse, por ejemplo, a través de un procedimiento ELISA explicado en el apartado (b) descrito anteriormente.

- 5 El hibridoma obtenido a través del procedimiento anteriormente descrito, puede conservarse en un estado congelado en nitrógeno líquido o en un refrigerador a una temperatura de -80 °C o inferior.

Después de finalizar la clonación, el medio se cambia de medio HT a un medio normal y se cultiva el hibridoma.

- 10 El cultivo a gran escala se realiza haciendo girar el cultivo usando un frasco de cultivo grande o a través de cultivo con agitación centrífuga. A partir del sobrenadante obtenido mediante el cultivo a gran escala, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína de la invención por purificación usando un procedimiento conocido por los expertos en la técnica, tal como filtración en gel.

Adicionalmente, el hibridoma se inyecta en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que la del hibridoma (por ejemplo, la cepa BALB/c descrita anteriormente) o de un ratón Nu/Nu para hacer proliferar el hibridoma, a través de lo cual puede obtenerse la ascitis que contiene una gran cantidad del anticuerpo monoclonal de la invención.

- 15 En el caso en el que el hibridoma se administre en la cavidad abdominal, si antes de administrar el hibridoma (de 3 a 7 días antes) se administra un aceite mineral, tal como 2,6,10,14-tetrametil pentadecano (pristano), puede obtenerse una mayor cantidad de ascitis.

- 20 Por ejemplo, para inactivar linfocitos T previamente se inyecta un inmunosupresor en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que la del hibridoma. Veinte días después, se suspenden de 10^6 a 10^7 células de clones de hibridoma en un medio asérico (0,5 ml) y la suspensión se inyecta en la cavidad abdominal del ratón. En general, cuando el abdomen se expande y se llena con la ascitis, esta se extrae del ratón. Mediante este procedimiento, el anticuerpo monoclonal puede obtenerse a una concentración que es aproximadamente 100 veces o más alta que la de en la solución del cultivo.

- 25 El anticuerpo monoclonal obtenido a través del procedimiento descrito anteriormente puede purificarse a través de un procedimiento descrito, por ejemplo, en Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978).

El anticuerpo monoclonal obtenido de este modo tiene alta especificidad antigénica por DR5.

(h) Ensayo del anticuerpo monoclonal

El isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal así obtenido puede determinarse de la siguiente manera.

- 30 En primer lugar, los ejemplos del procedimiento de identificación incluyen un procedimiento de Ouchterlony, un procedimiento ELISA y un procedimiento RIA.

Un procedimiento de Ouchterlony es sencillo, pero cuando la concentración del anticuerpo monoclonal es baja, se requiere una operación de condensación.

- 35 Por otro lado, cuando se utiliza un procedimiento ELISA o RIA, directamente haciendo reaccionar el sobrenadante del cultivo con una fase sólida adsorbida al antígeno y utilizando anticuerpos que corresponden a diversos tipos de isotipos y subclases de inmunoglobulinas como anticuerpos secundarios, el isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal pueden identificarse.

Además, como un procedimiento más sencillo, también puede utilizarse un kit de identificación disponible en el comercio (por ejemplo, el Kit Mouse Typer fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) o similar.

- 40 Adicionalmente, la determinación cuantitativa de una proteína puede realizarse a través del procedimiento de Folin Lowry y de un procedimiento de cálculo basado en la absorbancia a 280 nm [$1,4 \text{ (DO 280) = Inmunoglobulina 1 mg/ml}$].

- 45 Adicionalmente, incluso cuando el anticuerpo monoclonal se obtiene, por separado e independiente, realizando de nuevo las etapas (a) a (h) en el apartado (2) anterior, es posible obtener un anticuerpo que tenga una actividad citotóxica equivalente a la de B273. Como un ejemplo de un anticuerpo de este tipo, puede servir de ejemplo un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo B273. Si un anticuerpo monoclonal recién producido se une a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial a la cual se une el anticuerpo B273, puede determinarse que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo B273. Adicionalmente, confirmando que el anticuerpo monoclonal compite con el anticuerpo B273 por la unión con DR5 (esto es, el anticuerpo monoclonal inhibe la unión entre el anticuerpo B273 y DR5), puede determinarse que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo que el anticuerpo B273 incluso si no se ha determinado la secuencia o estructura epitépica específica. En el
- 50

caso en el que el anticuerpo monoclonal se una al mismo epítipo que el anticuerpo B273, se espera firmemente que el anticuerpo monoclonal tenga una actividad citotóxica equivalente a la de B273.

Adicionalmente, como se observa en el Ejemplo 4, es posible especificar un resto de aminoácido en el lado de DR5 que se encuentra adyacente a un fragmento Fab de un anticuerpo a partir de los datos de difracción de rayos X de un complejo entre el fragmento Fab y DR5. Específicamente, en el caso en el que un fragmento Fab procedente de un anticuerpo arbitrario se encuentre adyacente a un resto de glicina en la posición 26, a un resto de isoleucina en la posición 34, a un resto de ácido glutámico en la posición 36, a un resto de ácido aspártico en la posición 37, a un resto de glicina en la posición 38, a un resto de ácido aspártico en la posición 56, a un resto de leucina en la posición 57, a un resto de leucina en la posición 58, a un resto de fenilalanina en la posición 59, a un resto de leucina en la posición 61, y a un resto de arginina en la posición 62 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 23 en el listado de secuencias, a una distancia de 4 Å o menor, puede determinarse que el anticuerpo tiene especificidad por el mismo epítipo que B273.

(3) Otros anticuerpos

El anticuerpo de la invención no solo incluye el anticuerpo monoclonal descrito anteriormente contra DR5 sino también un anticuerpo recombinante obtenido por modificación artificial con el fin de disminuir la antigenicidad heteróloga en seres humanos, tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. Estos anticuerpos pueden producirse utilizando un procedimiento conocido.

Como anticuerpo quimérico, puede servir de ejemplo un anticuerpo en el que las regiones constante y variable del anticuerpo proceden de diferentes especies, por ejemplo, un anticuerpo quimérico en el que una región variable de anticuerpo procedente de ratón o de rata está unida a una región constante procedente de ser humano (véase Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)). Un anticuerpo quimérico procedente de un anticuerpo de ratón anti DR5 humano B273 es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que contiene una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 20 y una cadena ligera que contiene una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de SEQ ID NO: 16, y puede tener una región constante arbitraria. Como un ejemplo de dicho anticuerpo quimérico, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias y puede servir de ejemplo una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21-239 de SEQ ID NO: 16. Por otro lado, en la secuencia de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1 a 19 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 es una región variable y una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 142 a 471 es una región constante. Además, en la secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 16 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 1 a 20 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 es una región variable y una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 135 a 239 es una región constante.

La secuencia de aminoácidos de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias está codificada por una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 19 en el Listado de Secuencias. En la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 19 en el Listado de Secuencias, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 1 a 57 codifica la secuencia señal de cadena pesada del anticuerpo, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo y una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 424 a 1413 codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 16 en el Listado de Secuencias está codificada por una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 15 en el Listado de Secuencias. En la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 15 en el Listado de Secuencias, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 1 a 60 codifica la secuencia señal de cadena ligera del anticuerpo, una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo y una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 403 a 717 codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo.

Como anticuerpo humanizado, puede servir de ejemplo un anticuerpo obtenido integrando solo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) en un anticuerpo procedente de ser humano (véase Nature (1986) 321, págs. 522-525) y un anticuerpo obtenido injertando una parte de los restos de aminoácidos de la región marco conservada así como las secuencias CDR en un anticuerpo humano mediante un procedimiento de injertación de CDR (documento WO 90/07861).

Sin embargo, el anticuerpo humanizado procedente del anticuerpo B273 no está limitado a un anticuerpo humanizado específico siempre y cuando el anticuerpo humanizado tenga los 6 tipos de secuencias CDR de B273 y tenga la actividad de inducción de apoptosis en las células. Por otro lado, la región variable de cadena pesada del

anticuerpo B273 tiene una CDRH1 (GYFMN) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82 en el Listado de Secuencias, una CDRH2 (RFNPYNGDTFYNQKFKG) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 83, y una CDRH3 (SAYYFDSGGYFDY) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84. Además, la región variable de cadena ligera del anticuerpo B273

5 tiene una CDRL1 (RSSQSLVHNSGNTYLH) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 79 en el Listado de Secuencias, una CDRL2 (KVSNRFS) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80 y una CDRL3 (SQSTHVPWT) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 81.

Adicionalmente, una secuencia que incluye la sustitución, delección o adición de uno a varios restos de aminoácidos en una de las CDR descritas anteriormente puede usarse como una secuencia CDR que tiene un anticuerpo modificado en CDR procedente del anticuerpo B273. Los ejemplos de la secuencia que incluye una sustitución de un resto de aminoácido en la CDRL1 incluyen una secuencia (RSSQSLVHSNENTYLH) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 85 en el Listado de Secuencias, una secuencia (RSSQSLVHSNFNTYLH) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 86, una

10 secuencia (RSSQSLVHSNKNTYLH) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 87, y una secuencia (RSSQSLVHSNLNTYLH) que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 88. Además, los ejemplos de la secuencia que incluye una sustitución de un resto de aminoácido en la CDRH2 incluyen una secuencia (RFNPYNEDTFYHQKFKG) que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 89.

En general, la desamidación de asparagina en una proteína avanza a través de la formación de un estado de transición de succinimida cíclica entre la asparagina y un aminoácido adyacente en el lado C terminal (Geiger, T. y Clarke, S. (1987) Deamidation, Isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. J. Biol. Chem. 262, 785-794). Un factor limitante de tasa para la formación de un estado de transición de succinimida cíclica es el tamaño de una cadena lateral del aminoácido adyacente y, por lo tanto, la glicina que tiene la cadena lateral más corta, puede conseguir la tasa de desamidación más rápida. Por otro lado, sustituyendo el grupo adyacente en el lado C terminal con un aminoácido que tenga una cadena lateral larga, la tasa de desamidación puede suprimirse. El anticuerpo B273 tiene una secuencia -N-G-(asparagina-glicina) que es susceptible a desamidación en la CDRL1 y CDRH2. Por lo tanto, los autores de la presente invención produjeron mutantes puntuales en los que el grupo adyacente se cambió de glicina

20 a lisina, fenilalanina, leucina o ácido glutámico cada uno de los cuales tiene una cadena lateral más larga que la de la glicina. Es decir, en la CDRH2, la secuencia -N-G-(asparagina-glicina) está mutada a una secuencia -N-E-(asparagina ácido-glutámico) y en la CDRL1, la secuencia -N-G-(asparagina-glicina) está mutada a una secuencia -N-L-(asparagina-leucina), una secuencia -N-F-(asparagina-fenilalanina), una secuencia -N-K-(asparagina-lisina) o una secuencia -N-E-(asparagina-ácido glutámico), por lo cual la desamidación del anticuerpo se suprime.

Como un ejemplo de un anticuerpo que tiene las CDR anteriormente descritas, puede servir de ejemplo un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada que tiene una CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82 en el Listado de Secuencias, una CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 83 y una CDRH3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84 y una región variable de cadena ligera que tiene una CDRL1 que

35 consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 79 en el Listado de secuencias, una CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80 y CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 81; un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada que tiene una CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82 en el Listado de Secuencias, una CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 89 y una CDRH3 que consiste en un aminoácido secuencia representada por SEQ ID NO: 84, y una región variable de cadena ligera que tiene una CDRL1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 85 en el Listado de secuencias, una CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80, y una CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 81; un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada que tiene una CDRH1 que

40 consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82 en el Listado de Secuencias, una CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 89 y una CDRH3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84 y una región variable de cadena ligera que tiene una CDRL1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 86 en el Listado de secuencias, una CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80 y una

45 CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 81; un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada que tiene la CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82 en el Listado de Secuencias, una CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 89 y una CDRH3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84 y una región variable de cadena ligera que tiene una CDRL1 que consiste en una

50 secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 87 en el Listado de secuencias, una CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80 y una CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 81; y un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada que tiene una CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82 en el

55

60

- secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21-134 de SEQ ID NO: 28; un anticuerpo caracterizado porque contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 70 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de SEQ ID NO: 52; un anticuerpo caracterizado porque contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 70 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de SEQ ID NO: 58; un anticuerpo caracterizado porque contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 70 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de SEQ ID NO: 62; y un anticuerpo caracterizado porque contiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 70 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de SEQ ID NO: 66.
- Como una combinación más preferida, puede servir de ejemplo un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 42 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de SEQ ID NO: 28; un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 70 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de SEQ ID NO: 52; un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 70 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de SEQ ID NO: 58; un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 70 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de SEQ ID NO: 62; y un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 70 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de SEQ ID NO: 66.
- Combinando una secuencia que tenga una alta homología con la secuencia de aminoácidos de cadena pesada descrita anteriormente con una secuencia que tenga una alta homología con la secuencia de aminoácidos de cadena ligera descrita anteriormente, es posible seleccionar un anticuerpo que tenga una actividad citotóxica equivalente a la de cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente. La homología es generalmente una homología de 80 % o más, preferentemente una homología de 90 % o más, más preferentemente una homología de 95 % o más, aún más preferentemente una homología de 99 % o más. Además, combinando una secuencia de aminoácidos que incluya una sustitución, deleción o adición de uno a varios restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada o cadena ligera, también es posible seleccionar un anticuerpo que tenga una actividad citotóxica equivalente a la de cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente. El número de restos de aminoácidos a sustituir, deleccionar o añadir es generalmente de 10 o menor, preferentemente de 5 a 6 o menor, más preferentemente de 2 a 3 o menor, aún más preferentemente de 1.
- La homología entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo del programa Blast versión 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402) con parámetros por defecto. El algoritmo Blast también puede usarse a través de Internet mediante el acceso a la web www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Por otro lado, con el algoritmo Blast se calculan dos tipos de porcentajes de valores de identidad (o identidades) y positividad (o positividad). El primero es un valor cuando los restos de aminoácidos coinciden entre sí en dos secuencias de aminoácidos para cuyo grado de homología va a determinarse y el último es un valor obtenido considerando también los restos de aminoácidos que tienen una estructura química similar. En esta memoria descriptiva, el valor de la identidad cuando los restos de aminoácidos coinciden entre sí se usa como valor de homología.
- Por otro lado, en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 o 70 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 19 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 20 a 141 es una región variable, y una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 142 a 471 es una región constante. Además, en la secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 28, 30, 32, 52, 58, 62 o 66 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 1 a 20 es una secuencia señal, una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 21 a 134 es una región variable y una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 135 a 239 es una región constante.
- La secuencia de aminoácidos de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 o 70 en el Listado de Secuencias está codificada por una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49 o 69 en el Listado de Secuencias. En cada una de las secuencias de nucleótidos anteriores, una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1 a 57 codifica la secuencia señal de

cadena pesada del anticuerpo, una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 58 a 423 codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo y una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 424 a 1413 codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo.

5 La secuencia de aminoácidos de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 28, 30, 32, 52, 58, 62 o 66 en el listado de secuencias está codificada por una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 27, 29, 31, 51, 57, 61 o 65 en el Listado de Secuencias. En cada una de las secuencias de nucleótidos anteriores, una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1 a 60 codifica la secuencia señal de cadena ligera del anticuerpo, una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 61 a 402 codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo y una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 403 a 717 codifica la
10 región constante de cadena ligera del anticuerpo.

La homología entre cualquiera de estas secuencias de nucleótidos y una secuencia de nucleótidos de otro anticuerpo también puede determinarse usando el algoritmo Blast

Adicionalmente, el anticuerpo de la invención incluye un anticuerpo humano que se une al mismo epítipo que el anticuerpo B273, en el que el anticuerpo humano se caracteriza por que la secuencia de cadena pesada contiene una región variable que tiene CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y la CDRH1 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82, la CDRH2 comprende cualquiera de una de las secuencias de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 89 y 83 y la CDRH3 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84; y la secuencia de cadena ligera contiene una región variable que tiene CDRL1, CDRL2 y CDRL3 y la CDRL1 comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 87, 85, 86, 88 y 79, la CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80 y la CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 81, o un fragmento funcional del anticuerpo que tiene actividad de unión antigénica. Un anticuerpo anti-DR5 humano se refiere a un anticuerpo humano que solo tiene una secuencia génica de un anticuerpo procedente de un cromosoma humano. Un anticuerpo anti-DR5 humano puede obtenerse mediante un procedimiento usando un ratón productor de anticuerpos humanos que tiene un fragmento cromosómico humano que contiene genes de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano (véase Tomizuka, K. y col., Nature Genetics (1997) 16, págs. 133-143; Kuroiwa, Y. y col., Nucl. Acids Res. (1998) 26, págs. 3447-3448; Yoshida, H. y col., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, págs. 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. y Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, págs. 722-727, etc.).

30 Dicho ratón productor de anticuerpos humanos puede crearse específicamente de la siguiente manera. Un animal modificado genéticamente, en el que se ha alterado el locus génico exógeno de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina, y en su lugar, se ha introducido un locus génico de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humana, mediante un vector de cromosoma artificial de levadura (YAC, del inglés *yeast artificial chromosome*) o similar, se crea produciendo un animal genosuprimido (*knockout*) y un animal transgénico y cruzando estos
35 animales.

Adicionalmente, de acuerdo con una técnica de modificación por ingeniería genética, usando los ADNc que codifican dicha una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo humano, respectivamente, y preferentemente un vector que contiene los ADNc, se transforman células eucariotas y se cultiva un transformante que produce un anticuerpo monoclonal humano recombinante, mediante lo cual el anticuerpo también puede obtenerse a partir del sobrenadante de cultivo.
40

En este caso, como hospedador, pueden usarse, por ejemplo, células eucariotas, preferentemente células de mamífero, tales como células CHO, linfocitos o células de mieloma.

Adicionalmente, también se conoce un procedimiento de obtención de un anticuerpo humano procedente de presentación de fagos identificado de una biblioteca de anticuerpos humanos (véase Wormstone, I. M. y col., Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), págs. 2301-2308; Carmen, S. y col., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), págs. 189-203; Siriwardena, D. y col., Ophthalmology (2002) 109 (3), págs. 427-431, etc.).
45

Por ejemplo, puede usarse un procedimiento de presentación de fagos en el que una región variable de un anticuerpo humano se expresa en la superficie de un fago como un anticuerpo monocatenario (scFv, *single chain Fv*) y se selecciona un fago que se une a un antígeno (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), págs. 1105-1116) puede usarse.
50

Analizando al gen del fago seleccionado basándose en la unión con un antígeno, puede determinarse una secuencia de ADN que codifique la región variable de un anticuerpo humano que se une a un antígeno.

Si se determina la secuencia de ADN de un scFv que se une a un antígeno, puede obtenerse un anticuerpo humano preparando un vector de expresión que tenga la secuencia e introduciendo el vector en un hospedador apropiado que lo exprese (documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388, Annu. Rev. Immunol. (1994) 12, págs. 433-455, Nature Biotechnology (2005) 23 (9), págs. 1105-1116).
55

Si un anticuerpo humano recién producido se une a un péptido parcial o a una estructura terciaria parcial a la que se une el anticuerpo B273, puede determinarse que el anticuerpo humano y el anticuerpo B273 se unen al mismo epítipo. Además, confirmando que el anticuerpo humano compite con el anticuerpo B273 por la unión con DR5 (es decir, el anticuerpo humano inhibe la unión entre el anticuerpo B273 y DR5), puede determinarse que el anticuerpo humano y el anticuerpo B273 se unen al mismo epítipo incluso si no se ha determinado la secuencia o estructura epitópica específica. Cuando se confirma que el anticuerpo humano y el anticuerpo B273 se unen al mismo epítipo, es de esperar contundentemente que el anticuerpo humano tenga una actividad citotóxica equivalente a la de B273.

Adicionalmente, como se muestra en el Ejemplo 4, es posible especificar un resto de aminoácido en el lado de DR5 que se encuentra adyacente a un fragmento Fab de un anticuerpo a partir de los datos de difracción de rayos X de un complejo entre el fragmento Fab y DR5. Específicamente, en el caso en el que un fragmento Fab procedente de un anticuerpo arbitrario se encuentre adyacente a un resto de glicina en la posición 26, a un resto de isoleucina en la posición 34, a un resto de ácido glutámico en la posición 36, a un resto de ácido aspártico en la posición 37, a un resto de glicina en la posición 38, a un resto de ácido aspártico en la posición 56, a un resto de leucina en la posición 57, a un resto de leucina en la posición 58, a un resto de fenilalanina en la posición 59, a un resto de leucina en la posición 61 y a un resto de arginina en la posición 62 de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 23 en el Listado de Secuencias, a una distancia de 4 Å o menor, puede determinarse que el anticuerpo se une al mismo epítipo que B273.

Los anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos obtenidos mediante el procedimiento descrito anteriormente se evaluaron con respecto a la propiedad de unión con un antígeno mediante un procedimiento mostrado en el Ejemplo 3 o similar, y puede seleccionarse un anticuerpo preferido. Como un ejemplo de otro índice para su uso en la comparación de las propiedades de los anticuerpos, puede servir de ejemplo la estabilidad de los anticuerpos. En el Ejemplo 10 se muestra la calorimetría diferencial de barrido (DSC) que es un dispositivo con capacidad de medir rápida y exactamente una temperatura en el punto medio de desnaturalización térmica (T_m) a usar como un índice favorable de la estabilidad conformacional relativa de las proteínas. Midiendo los valores T_m usando DSC y comparando los valores, puede compararse la diferencia en cuanto a la estabilidad térmica. Se sabe que la estabilidad del almacenamiento de los anticuerpos muestra alguna correlación con la estabilidad térmica de los anticuerpos (Lori Burton, y col., *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, págs. 265-273) y puede seleccionarse un anticuerpo preferido usando como índice la estabilidad térmica. Los ejemplos de otros índices para seleccionar anticuerpos incluyen los siguientes factores: el rendimiento en una célula hospedadora apropiada es alta y la agregabilidad en una solución acuosa es baja. Por ejemplo, un anticuerpo que muestra el mayor rendimiento no siempre muestra la mayor estabilidad térmica, y por lo tanto, es necesario seleccionar un anticuerpo sumamente adecuado para la administración a seres humanos haciendo una evaluación exhaustiva basándose en los índices descritos anteriormente.

Adicionalmente, también se conoce un procedimiento en el que las secuencias de cadena ligera y pesada de longitud completa de un anticuerpo se conectan usando un enlazador apropiado, mediante lo cual se obtiene una inmunoglobulina monocatenaria (Lee, H-S, y col., *Molecular Immunology* (1999) 36, págs. 61-71; Shirmann, T. y col., *mAbs* (2010), 2, (1) pp. 1-4). Al dimerizar dicha inmunoglobulina monocatenaria, el dímero resultante puede tener una actividad y una estructura similares a las de un anticuerpo que es en sí mismo un tetrámero. En el presente documento también se desvela un anticuerpo que tiene una región variable de cadena pesada sencilla y que no tiene una secuencia de cadena ligera. Dicho anticuerpo se denomina anticuerpo de un solo dominio (sdAb, *single domain antibody*) o nanocuerpo, y de hecho, dicho un anticuerpo se observa en camélidos y en llamas y se ha notificado que tiene una afinidad de unión antigénica (Muyldemans S. y col., *Protein Eng.* (1994) 7 (9), 1129-35, Hamers-Casterman C. y col., *Nature* (1993) 363 (6428) 446-8). Los anticuerpos descritos anteriormente se incluyen en el anticuerpo de acuerdo con la invención

Adicionalmente, controlando la glucosilación en la que un glucano está unido al anticuerpo de la invención, es posible potenciar la actividad citotóxica dependiente de anticuerpo. Como técnica para controlar la glucosilación de anticuerpos, se conocen los documentos WO 99/54342, WO 00/61739, WO 02/31140, etc. Sin embargo, no está limitada a estos documentos.

En el caso en el que un anticuerpo se produzca aislando primero un gen de anticuerpo y después introduciendo el gen en un hospedador apropiado, puede usarse una combinación de un hospedador apropiado y un vector de expresión apropiado. Ejemplos específicos del gen de anticuerpo incluyen una combinación de un gen que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo descrito en esta memoria descriptiva y un gen que codifica una secuencia de cadena ligera de la misma. Cuando una célula hospedadora se transforma, es posible insertar el gen de secuencia de cadena pesada y el gen de secuencia de cadena ligera en el mismo vector de expresión, y también en diferentes vectores de expresión por separado. En los casos en los que como hospedador se usen células eucariotas, pueden usarse células animales, células vegetales y microorganismos eucariotas. Como células animales, pueden servir de ejemplo (1) células de mamífero, por ejemplo, cepas con déficit de dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1980) 77, págs. 4126-4220) de células COS de simio (Gluzman, Y., *Cell*, (1981) 23, págs. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos murinos NIH3T3 (células CHO ATCC n.º CRL-1658) y células de ovario de hámster chino (CHO cells; ATCC: CCL-61). Adicionalmente, en el caso en el que se usen células procariontas, pueden ilustrarse, por ejemplo, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Introduciendo un gen de anticuerpo diana en estas células a través de transformación y cultivando las células así

transformadas *in vitro*, puede obtenerse el anticuerpo. En el procedimiento de cultivo descrito anteriormente, el rendimiento puede variar algunas veces dependiendo de la secuencia del anticuerpo, y por lo tanto, es posible seleccionar un anticuerpo que se produzca fácilmente como un agente farmacéutico usando el rendimiento como un índice entre los anticuerpos que tienen actividad de unión comparable.

- 5 No hay limitación sobre el isotipo del anticuerpo de la invención, y los ejemplos de los mismos incluyen IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (IgA1, IgA2), IgD e IgE, y ejemplos preferidos de los mismos incluyen IgG e IgM, y adicionalmente ejemplos más preferidos de los mismos incluyen IgG1 e IgG2.

Adicionalmente, el anticuerpo de la invención puede ser un fragmento funcional del anticuerpo que tenga un sitio de unión antigénica del anticuerpo o un fragmento modificado del mismo. El fragmento del anticuerpo puede obtenerse tratando el anticuerpo como una proteasa, tal como papaína o pepsina, o modificando el gen de anticuerpo de acuerdo con una técnica de modificación por ingeniería genética y expresando el gen modificado en células de cultivo adecuadas. Entre estos fragmentos de anticuerpo, un anticuerpo que tenga todas o parte de las funciones de la molécula del anticuerpo de longitud completa puede recibir el nombre de fragmento funcional del anticuerpo. Como funciones del anticuerpo, pueden servir de ejemplo, en general, una actividad de unión antigénica, una actividad de neutralización de la actividad de un antígeno, una actividad de potenciación de la actividad de un antígeno, una actividad citotóxica dependiente de anticuerpo, una actividad citotóxica dependiente del complemento y una actividad citotóxica celular dependiente del complemento. La función del fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la invención es la actividad de unión a DR5, preferentemente la actividad de inducción de la apoptosis en células, más preferentemente la actividad citotóxica a través de la inducción de la apoptosis en células cancerosas. Sin embargo, el anticuerpo de la invención puede tener actividad citotóxica dependiente de anticuerpo, actividad citotóxica dependiente de complemento y/o actividad citotóxica celular dependiente de complemento así como actividad de inducción de la apoptosis en células.

Los ejemplos del fragmento del anticuerpo incluyen Fab, F(ab')₂, Fv, Fv monocatenario (scFv) en el que las moléculas de Fv de la cadena pesada y de la cadena ligera están conectadas mediante un enlazador apropiado, un diacuerpo (diacuerpos), un anticuerpo lineal y un anticuerpo poliespecífico compuesto del fragmento de anticuerpo. Adicionalmente, el fragmento Fab', que es un fragmento monovalente en una región variable de un anticuerpo obtenido tratando F(ab')₂ en condiciones reductoras, también se incluye en el fragmento del anticuerpo.

Adicionalmente, el anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo poliespecífico con especificidad por al menos dos antígenos diferentes. En general, dicha molécula se une a dos antígenos (es decir, anticuerpo biespecífico), sin embargo, la expresión "anticuerpo poliespecífico" como se usa en el presente documento incluye un anticuerpo que tiene especificidad por dos o más (por ejemplo, tres) antígenos.

El anticuerpo poliespecífico de la invención puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de dicho anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico F(ab')₂). El anticuerpo biespecífico puede producirse conectando las cadenas pesada y ligera (pares HL) de dos tipos de anticuerpos, o también puede producirse fusionando hibridomas que producen diferentes anticuerpos monoclonales para preparar células fusionadas productoras de anticuerpos biespecíficos (Millstein y col., *Naturaleza* (1983) 305, págs. 537-539).

El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo monocatenario (también denominado scFv). El anticuerpo monocatenario puede obtenerse conectando la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo mediante un enlazador polipeptídico (Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 113 (editado por Rosenberg y Moore), Springer Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994), *Nature Biotechnology* (2005), 23, págs. 1126-1136). Además, un fragmento BiscFv producido conectando dos moléculas de scFv mediante un enlazador polipeptídico también puede usarse como anticuerpo biespecífico.

En este campo técnico se conoce un procedimiento de producción de un anticuerpo monocatenario (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.946.778, 5.260.203, 5.091.513, 5.455.030, etc.). En este scFv, la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera están conectadas mediante un enlazador que no forma un conjugado, preferentemente mediante un enlazador polipeptídico (Huston, J. S. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988), 85, págs. 5879-5883). En el scFv, la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera pueden proceder del mismo anticuerpo o de anticuerpos diferentes.

Como enlazador polipeptídico a usar para conectar las regiones variables, se usa un péptido monocatenario determinado compuesto de 12 a 19 restos, por ejemplo.

El ADN que codifica un scFv puede obtenerse realizando amplificación usando, como molde, un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos completa o una secuencia de aminoácidos parcial deseada de un ADN seleccionado de un ADN que codifica la cadena pesada o la región variable de cadena pesada del anticuerpo descrito anteriormente y un ADN que codifica la cadena ligera o la región variable de cadena ligera del mismo, mediante un procedimiento de PCR usando un par de cebadores que define ambos extremos del mismo, y adicionalmente realizando amplificación combinando un ADN que codifica una parte del enlazador polipeptídico y un par de cebadores que define ambos extremos del mismo para poner en contacto los dos extremos con la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente.

Adicionalmente, una vez que se produce el ADN que codifica un scFv, puede obtenerse un vector de expresión que contenga el mismo y un hospedador transformado por el vector de expresión de acuerdo con un procedimiento habitual. Adicionalmente, usando el hospedador resultante, el scFv puede obtenerse de acuerdo con un procedimiento habitual. Un fragmento de anticuerpo del mismo puede producirse en un hospedador obteniendo un gen y expresando el gen de la misma manera que la descrita anteriormente.

El anticuerpo de la invención puede multimerizarse para aumentar su afinidad por un antígeno. El anticuerpo a multimerizar puede ser un tipo de anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos que reconoce una pluralidad de epítomos del mismo antígeno. Como un procedimiento de multimerización del anticuerpo, puede servir de ejemplo la unión del dominio CH3 de IgG con dos moléculas scFv, la unión con estreptavidina y la introducción de un motivo hélice-giro-hélice.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal que es una mezcla de varios tipos de anticuerpos anti-DR5 que tienen secuencias de aminoácidos diferentes. Como un ejemplo del anticuerpo policlonal, puede ilustrarse una mezcla de tipos varios de anticuerpos que tienen diferentes CDR. Como tal anticuerpo policlonal, pueden usarse anticuerpos obtenidos cultivando una mezcla de células que produce diferentes anticuerpos y después purificando los anticuerpos del cultivo resultante (véase el documento WO 2004/061104).

Como un anticuerpo modificado, también puede usarse un anticuerpo unido a cualquiera de los diversos tipos de moléculas, tal como polietilenglicol (PEG).

Adicionalmente, el anticuerpo de la invención puede estar en forma de un conjugado formado entre cualquiera de estos anticuerpos y otro agente medicinal (inmunoconjugado). Los ejemplos de dicho anticuerpo incluyen uno en el que el anticuerpo está conjugado con un material radiactivo o un compuesto que tenga una acción farmacológica (Nature Biotechnology (2005) 23, págs. 1137-1146).

El anticuerpo obtenido puede purificarse hasta la homogeneidad. La separación y purificación del anticuerpo pueden realizarse empleando un procedimiento convencional de purificación y separación de proteínas. Por ejemplo, el anticuerpo puede separarse y purificarse seleccionando y combinando apropiadamente cromatografía en columna, filtración con filtro, ultrafiltración, precipitación salina, diálisis, electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida, electroforesis e isoelectroenfoque y similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak y col. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero los procedimientos no están limitados a estos.

Los ejemplos de dicha cromatografía incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción.

Dicha cromatografía puede realizarse empleando cromatografía líquida tal como HPLC o FPLC.

Como una columna a usar en cromatografía de afinidad, puede servir de ejemplo una columna de proteína A y una columna de proteína G.

Por ejemplo, como una columna que usa una columna de Proteína A, puede ilustrarse, Hiper D, POROS y Sepharose FF (Pharmacia). Adicionalmente, usando un vehículo que tenga un antígeno inmovilizado en el mismo, el anticuerpo también puede purificarse utilizando la propiedad de unión del anticuerpo con el antígeno.

(4) Ejemplos específicos de otros anticuerpos anti-DR5

Anticuerpos anti-DR5 que inducen la apoptosis en células que expresan DR5 se describen, por ejemplo, en los documentos WO 98/51793, WO 2001/83560, WO 2002/94880, WO 2003/54216, WO 2006/83971 y WO 2007/22157. Adicionalmente, los anticuerpos anti-DR5 denominados tigatuzumab (CS-1008), lexatumumab (HGS-ETR2), HGS-TR2J, drozitumab (APOMAB), conatumumab (AMG-655) y LBY135 aún se encuentran en ensayos clínicos o estuvieron en ensayos clínicos en el pasado. Los anticuerpos anti-DR5 que aún continúan en ensayos clínicos hasta la fecha en la que se presentó esta solicitud son tigatuzumab, lexatumumab, y conatumumab. Los nuevos anticuerpos anti-DR5 descritos en la presente memoria descriptiva tienen una actividad antitumoral superior *in vitro* y/o *in vivo* en comparación con tigatuzumab, lexatumumab, conatumumab y drozitumab, anteriormente descritos.

3. Compuestos farmacéuticos que contienen anticuerpos anti-DR5

Los anticuerpos obtenidos mediante el procedimiento descrito en el apartado anterior "2. Producción de anticuerpos monoclonales anti-DR5" pueden usarse como un agente farmacéutico, particularmente un agente terapéutico y/o preventivo para el cáncer dado que cada uno de los anticuerpos actúa *in vivo* como un agonista para un receptor relacionado con la apoptosis, DR5, e induce la apoptosis en células cancerosas mediante el receptor para exhibir una actividad citotóxica.

La actividad citocida exhibida por un anticuerpo *in vitro* puede determinarse midiendo su actividad inhibiendo la proliferación de células que sobreexpresan un receptor relacionado con la apoptosis.

5 Por ejemplo, se cultiva una línea de células de cáncer que sobreexpresa DR5, se añade un anticuerpo al sistema de cultivo a diferentes concentraciones, y puede medirse la actividad inhibidora contra la formación de focos, formación de colonias y proliferación de esferoides.

El efecto terapéutico *in vivo* de un anticuerpo sobre el cáncer usando animales experimentales puede determinarse, por ejemplo, midiendo un cambio en las células cancerosas administrando el anticuerpo a ratones desnudos a los que se les implanta una línea celular tumoral que sobreexpresa DR5.

10 Los ejemplos del tipo de cáncer incluyen cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer tiroideo, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer uterino, melanoma, glioblastoma y cáncer de células sanguíneas (tal como leucemia y linfoma), sin embargo, el tipo de cáncer no está limitado a estos siempre que la célula cancerosa a tratar exprese DR5.

15 Adicionalmente, se sabe que un anticuerpo contra DR5 induce apoptosis en células inflamatorias (J. Clin. Invest. 1996, 98 (2), 271-278; Int. Immunol. 1996, 8 (10), 1595-1602). Por lo tanto, el anticuerpo de la invención y los anticuerpos como los desvelados en el presente documento también pueden usarse como un agente terapéutico para una respuesta autoinmunitaria o una respuesta inflamatoria. Los ejemplos de la enfermedad autoinmunitaria o enfermedad inflamatoria incluyen lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Hashimoto, artritis reumatoide, enfermedad de injerto contra huésped, síndrome de Sjogren, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Crohn, anemia hemolítica autoinmunitaria, esterilidad, 20 miastenia grave, esclerosis múltiple, enfermedad de Basedow, púrpura trombocitopénica, diabetes mellitus insulino dependiente, alergia, asma, una enfermedad atópica, arterioesclerosis, miocarditis, cardiomiopatía, glomerulonefritis, anemia aplásica, y rechazo después de trasplante de órgano.

25 Una sustancia a usar en una preparación aceptable en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención es preferentemente no tóxica para una persona a la cual va a administrarse la composición farmacéutica en términos de dosis y concentración.

30 La composición farmacéutica de la invención puede contener una sustancia para uso farmacéutico que tenga la capacidad de cambiar o mantener el pH, la presión osmótica, viscosidad, transparencia, color, isotonicidad, condición aséptica, estabilidad, solubilidad, tasa de liberación, tasa de absorción y permeabilidad de la misma. Los ejemplos de dicha sustancia para uso farmacéutico incluyen, pero sin limitación, aminoácidos, tales como glicina, alanina, glutamina, asparagina, arginina y lisina; agentes antimicrobianos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico, sulfato sódico y hidrogenosulfato sódico; tampones, tales como tampones de fosfato, citrato, borato, hidrogeno carbonato sódico, y soluciones de Tris-HCl; cargas, tales como, manitol y glicina; agentes quelantes, tales como, tetra acetato de etilendiamina (EDTA); agentes formadores de complejos, tales como, cafeína, polivinilpirrolidona, β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina; expansores tales como glucosa, manosa y dextrina; otros hidratos de 35 carbono, tales como, monosacáridos y disacáridos; agentes colorantes; esencias; diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; conservantes, tales como polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y peróxido de hidrógeno; disolventes tales como glicerina, propilenglicol y polietilenglicol; alcoholes de azúcar tales como manitol y sorbitol; agentes de 40 suspensión; tensioactivos tales como éster de sorbitán, polisorbatos, incluyendo polisorbato 20 y polisorbato 80, Tritón, trometamina, lecitina y colesterol; agentes potenciadores de la estabilidad tales como sacarosa y sorbitol; agentes potenciadores de la elasticidad tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio y manitol y sorbitol; agentes transportadores; excipientes; y/o adyuvantes farmacéuticos. La cantidad de estas sustancias para uso farmacéutico es preferentemente de 0,01 a 100 veces, en particular, preferentemente de 0,1 a 10 veces el peso del anticuerpo 45 anti-DR5. Los expertos en la técnica pueden determinar apropiadamente una formulación preferida de la composición farmacéutica en una preparación dependiendo de la enfermedad a la que cual se aplique la composición, la vía de administración a aplicar o similar.

50 El excipiente o vehículo en la composición farmacéutica puede estar en forma de un líquido o un sólido. Un excipiente o vehículo apropiado puede ser agua inyectable, solución salina fisiológica, un líquido cefalorraquídeo artificial u otra sustancia normalmente usada para administración parenteral. Además, como vehículo también puede usarse una solución salina fisiológica neutra o una solución salina fisiológica que contenga albúmina de suero. La composición farmacéutica puede contener un tampón Tris de pH 7,0 a 8,5, un tampón acetato de pH 4,0 a 5,5 o un tampón citrato de pH 3,0 a 6,2. Adicionalmente, dicho tampón puede complementarse con sorbitol u otro compuesto.

55 Los ejemplos de la composición farmacéutica de la invención incluyen una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-DR5 o una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-DR5 y al menos un agente terapéutico para el cáncer. La composición farmacéutica puede prepararse en forma de un producto liofilizado o un líquido como un agente medicinal que tenga una composición seleccionada y una pureza requerida. La composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-DR5 y la composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-DR5 y al menos un agente terapéutico para el cáncer también puede formarse en un producto liofilizado usando un

excipiente apropiado tal como sacarosa.

En la composición farmacéutica descrita anteriormente, el agente terapéutico para el cáncer a incorporar junto con el anticuerpo anti-DR5, puede administrarse simultáneamente, independientemente de, o secuencialmente con el anticuerpo anti-DR5, o el agente terapéutico y el anticuerpo anti-DR5 pueden administrarse a intervalos de dosificaciones diferentes. Los ejemplos de dicho agente terapéutico para el cáncer incluyen abraxano, carboplatino, cisplatino, gemcitabina, irinotecán (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinblastina, 5-FU, y los agentes medicinales descritos en el documento WO 2003/038043, sin embargo, el agente no está limitado a estos siempre que el agente sea un agente medicinal que tenga una actividad antitumoral.

La composición farmacéutica de la invención puede prepararse para administración parenteral o para absorción gastrointestinal a través de administración oral. La composición y concentración de una preparación puede determinarse dependiendo del procedimiento de administración. Cuanto mayor sea la afinidad por DR5 del anticuerpo anti-DR5 contenido en la composición farmacéutica de la invención, es decir, menor su constante de disociación (valor K_d) por DR5, más puede exhibir el anticuerpo anti-DR5 su eficacia farmacológica incluso cuando disminuya la dosis para seres humanos. Por lo tanto, la dosis de la composición farmacéutica de la invención para seres humanos también puede determinarse basándose en este hecho. Al igual que para la dosis, en el caso en el que un anticuerpo anti-DR5 humano se administre a seres humanos, el anticuerpo puede administrarse a una dosis de aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg una vez de uno a 180 días.

Los ejemplos de la forma de dosificación de la composición farmacéutica de la invención incluyen inyecciones, infusiones, supositorios, agentes transnasales, agentes sublinguales y absorbentes percutáneos.

En lo sucesivo en el presente documento, la invención se describirá más específicamente con referencia a los Ejemplos, sin embargo, la invención no se limita a los mismos. Obsérvese que las respectivas operaciones en relación con la manipulación genética en los siguientes ejemplos se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en "Molecular Cloning" (escrito por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., publicado por Cold Spring Harbor Laboratory Press in 1989) o en el caso del uso de reactivos o kits disponibles en el comercio, estos se usan de acuerdo con los protocolos adjuntos al mismo a menos que se indique lo contrario.

[Ejemplo 1] Producción de anticuerpo B273 de ratón

1) -1 Producción de la proteína DR5 humana (proteína de fusión dominio extracelular de DR5 humano/Fc humano)

1) -1-1 Producción del vector de expresión del dominio extracelular de DR5 humano

Se construyó un vector que expresaba la proteína DR5 humana (isoforma 2: NP_671716) insertando un gen, en el que se fusionó el dominio extracelular de DR5 humano con una región de IgG1/Fc humana, aguas abajo del promotor de CMV (citomegalovirus).

1) -1-2 Producción de la proteína DR5 humana

La introducción del vector de expresión en células 293 FreeStyle y la recogida del sobrenadante de cultivo la realizó Invitrogen Corporation (actualmente Life Technologies Japón Ltd.).

1) -1-3 Purificación de la proteína DR5 humana

El sobrenadante de cultivo obtenido en el apartado b) anterior se purificó usando cromatografía de columna de afinidad con Proteína A. Se aplicaron 5 l del sobrenadante de cultivo a "HiTrap Protein AFF" (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., Cat. n.º 17-5079-01) equilibrada con PBS, seguido de lavado con PBS. Posteriormente, se añadió una solución de arginina 2 M (pH 4,0) a la columna y se recogió una fracción que contenía la proteína DR5 humana. La fracción se añadió a un dispositivo de filtro de centrifuga (Amicon Ultra-4, peso molecular fraccional: 10 K, Millipore Co., Ltd.) y se realizaron un reemplazo de líquido con PBS y una condensación. El volumen final se constituyó hasta 6 ml, que se usó como una muestra purificada (rDR5-hFc). La determinación cuantitativa del producto de proteína purificado se realizó usando el "Kit de Ensayo de Proteínas Micro BCA" (PIERCE N.º 23235). Como un patrón de referencia, se usó el "patrón de albúmina" contenido en el kit.

1) -2 Inmunización

Se usaron ratones BALB/cAJcl (CLEA Japón, Inc.) de 5 a 6 semanas de vida. El día 0, se administró, por vía subcutánea, una mezcla de 50 µg de rDR5-hFc, preparada en el apartado 1) -1-3, y adyuvante completo de Freund (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (a una proporción de volumen de 1:1) cerca del pescuezo de cada ratón. Los días 14 y 28, se administró, por vía subcutánea, una mezcla de 50 µg de rDR5-hFc y adyuvante incompleto de Freund (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (a una proporción de volumen de 1:1) en la región dorsal de cada ratón. El día 42, se administraron 50 µg de rDR5-hFc en la cavidad abdominal de cada ratón y el día 45, se extirpó el bazo de cada ratón y se usó para la producción de hibridomas.

1) -3 Producción de hibridomas

Esplenocitos y células P3X63Ag8U.1 de mieloma de ratón se sometieron a fusión celular usando PEG 4000 (fabricado por Immunobiological Laboratories Co., Ltd.) y las células fusionadas resultantes se diluyeron con Medio de Selección D de ClonaCell-HY (fabricado por StemCell Technologies, Inc., n.º 03804) y se cultivaron. Después, se recogieron las colonias de hibridoma formadas, mediante las cuales se produjeron hibridomas monoclonales. Las colonias de hibridoma recogidas se cultivaron por separado y, usando el sobrenadante de cultivo obtenido de cada hibridoma, se identificó un hibridoma productor de anticuerpos anti-DR5.

1) -4 Identificación de anticuerpos por el procedimiento de ELISA celular

1) -4-1 Construcción del vector de expresión mutante DR5 humano (pcDNA3.1-DR5M)

Un cDNA que codifica la proteína DR5 humana (isoforma 2: NP_671716) se clonó en un vector pcDNA3.1(+) y se construyó un vector de expresión modificado con dominio de muerte pcDNA3.1-DR5M que se diseñó para expresar una proteína en la que el aminoácido L en la posición 334 en el dominio de muerte estaba sustituido por D.

1) -4-2 Preparación de células que expresan el gen antigénico

Se prepararon células HEK 293 a $7,5 \times 10^5$ células/ml en medio DMEM que contenía FBS al 10 %. Después, células HEK 293 se transfectaron con el vector de expresión de DR5 modificado con dominio de muerte pcDNA3.1-DR5M o pcDNA3.1-simulado que servía como un control, usando Lipofectamine 2000 (fabricado por Life Technologies Ltd. Japón) y cada suspensión celular se dispuso a 50 µl/pocillo en una microplaca de tamaño medio de 96 pocillos (fabricada por Corning Incorporated). Las células se cultivaron durante una noche en medio DMEM que contenía FBS al 10 % en condiciones de temperatura de 37 °C y con CO₂ al 5 %. Las células transfectadas así obtenidas en un estado adherente se usaron como tales en un ELISA celular.

1) -4-3 ELISA celular

Después de retirar el sobrenadante del cultivo de las células HEK 293 transfectadas con el vector de expresión preparado en el apartado 1) -4-2, el sobrenadante de cultivo de hibridoma se añadió a cada una de las células HEK 293 transfectadas con pcDNA3.1-DR5M y a las células HEK 293 transfectadas con pcDNA3.1-simulado, y la placa se dejó reposar a 4 °C durante 1 hora. Después de lavar las células de cada pocillo una vez con PBS que contenía FBS al 5 %, a cada pocillo se le añadió anti-IgG de ratón de cabra, conjugado con peroxidasa (fabricado por Chemicon Co., Ltd., n.º AP181P) diluido a 500 veces con PBS que contenía FBS al 5 %, y la placa se dejó reposar a 4 °C durante 1 hora. Después de lavar las células de cada pocillo 5 veces con PBS que contenía FBS al 5 %, una solución reveladora de color OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y H₂O₂ se disolvieron a 0,4 mg/ml y al 0,6 % (v/v), respectivamente, en una solución para disolver OPD (citrate trisódico 0,05 M y dodecahidrato fosfato de hidrógeno disódico 0,1 M pH 4,5) se añadió a 25 µl/pocillo. Se dejó proseguir una reacción de revelado de color mientras algunas veces se agitaba la mezcla de reacción, y la reacción de revelado de color se detuvo añadiendo HCl 1 M a 25 µl/pocillo. Después de esto, se midió una absorbancia a 490 nm usando el lector de placa (ARVO, fabricado por Perkin Elmer, Inc.). Para seleccionar un hibridoma que produjese un anticuerpo que se uniese específicamente a DR5 expresado en la membrana celular, se seleccionó un hibridoma que producía un sobrenadante de cultivo que, en comparación con las células HEK293 transfectadas con el pcDNA3.1-simulado (control), mostraba una mayor absorbancia en las células HEK 293 transfectadas con el vector de expresión pcDNA3.1-DR5M, que era positivo para la producción de un anticuerpo anti-DR5

1) -5 Identificación del anticuerpo por el procedimiento de citometría de flujo

1) -5-1 Preparación de células que expresan el gen antigénico

Se sembraron células 293T a 5×10^4 células/cm² en un matraz de 225 cm² (fabricado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) y se cultivaron durante una noche en medio DMEM que contenía FBS al 10 % en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %. Al siguiente día, las células 293T se transfectaron con pcDNA3.1-DR5M o pcDNA3.1-simulado que sirve como un control usando Lipofectamine 2000 y cultivado adicionalmente durante una noche en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %. Al día siguiente, las células 293T transfectadas con el vector de expresión se trataron con TrypLE Express (fabricado por Life Technologies Japón Ltd.). Después, las células se lavaron con DMEM que contenía FBS al 10 %, y después de esto se suspendieron en PBS que contenía FBS al 5 %. La suspensión celular así obtenida se usó en un análisis de citometría de flujo.

1) -5-2 Análisis de citometría de flujo

La suspensión celular 293T preparada en 1) -5-1 se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Después, el sobrenadante de cultivo de hibridoma se añadió a cada una de las células 293T transfectadas con pcDNA3.1-DR5M y las células 293T transfectadas con pcDNA3.1-simulado para suspender las células, y las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Después las células se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 5 %, una fracción de IgG de cabra conjugada con fluoresceína contra IgG de ratón (molécula entera) (fabricada por Cappel Co., Ltd., n.º 55493) diluida 1.000 veces con PBS que contenía FBS al 5 % se añadió al mismo para suspender las

células, y las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Después las células se lavaron 3 veces con PBS que contenía FBS al 5 %, las células se resuspendieron en PBS que contenía FBS al 5 % complementado con 7-aminoactinomicina D 2 µg/ml (fabricado por Invitrogen (Molecular Probes) Corporation) y la detección se realizó usando un flujocitómetro (FC500, Beckman Coulter, Inc.). Los datos se analizaron usando FlowJo (Tree Star, Inc.). Las células muertas positivas a 7-aminoactinomicina D se excluyeron usando una selección. Después, se crearon histogramas de intensidad de fluorescencia FITC de células viables. Un hibridoma que produce una muestra que da una mayor intensidad de fluorescencia en el histograma de intensidad de fluorescencia de las células 293T transfectadas con pcDNA3.1-DR5M en comparación con el histograma de intensidad de fluorescencia de las células 293T transfectadas con pcDNA3.1-simulado que sirve como control se seleccionaron para ser positivas para la producción de un anticuerpo anti-DR5.

1) -6 Exploración en términos de efecto citocida

Usando los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas seleccionados que eran positivos para la producción de un anticuerpo anti-DR5 en 1) -4 y 1) -5, se confirmó un efecto inductor de muerte celular en la línea celular Jurkat de linfocito T humano. El anti IgG Fc de ratón de cabra AffiniPure específico (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 115-005-071) preparado a 50 µg/ml con Tris-HCl 5 mM (pH 8,5) se dispensó a 25 µl/pocillo en una microplaca de media área de 96 pocillos (fabricada por Corning Incorporated) y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después cada pocillo se lavó dos veces con PBS, se añadió un sobrenadante de cultivo de hibridoma a cada pocillo y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después cada pocillo se lavó dos veces con PBS, se prepararon células Jurkat a $4,0 \times 10^4$ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % se añadieron a 25 µl/pocillo y se cultivaron en las condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % durante 20 horas. El efecto citocida del anticuerpo monoclonal anti-DR5 presente en el sobrenadante del cultivo de hibridoma se evaluó mediante determinación cuantitativa de la cantidad de ATP procedente de células viables usando un kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega Corporation, n.º G7571). Como resultado, se establecieron hibridomas que producían 5 tipos de anticuerpos monoclonales (B086, B139, B192, B273 y B467), cada uno de ellos mostraron una disminución en la cantidad de ATP al 80 % o más en comparación con el caso de añadir el medio para cultivar el hibridoma.

1) -7 Determinación de isotipo del anticuerpo monoclonal

Los isotipos de los anticuerpos monoclonales se determinaron usando el kit de isotipificado monoclonal de ratón (fabricado por Abd Serotec, Inc.). Como resultado, se confirmó el isotipo de B086, B139, B192, B273, B467 que era la cadena κ de IgG1.

1) -8 Preparación del anticuerpo monoclonal

El anticuerpo monoclonal se purificó de la ascitis de un ratón al que se implantó un hibridoma (en el presente documento en lo sucesivo denominado "material de partida para la purificación del anticuerpo").

La ascitis de ratón se preparó de la siguiente manera. En primer lugar, ratones BALB/cAJcl-nu/nu (Japón SLC, Inc.) de 7 a 8 semanas de vida se trataron con pristano (fabricado por Sigma Co., Ltd.) y después de aproximadamente 3 semanas, se implantó un hibridoma lavado con solución salina fisiológica, en la cavidad abdominal a 1×10^7 células por ratón. Después de 1 a 2 semanas, la ascitis acumulada en la cavidad abdominal se recogió y se esterilizó a través de un filtro de malla de 0,22 µm y el material resultante se usó como material de partida para la purificación del anticuerpo.

El anticuerpo se purificó mediante Hitrap MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.). Es decir, el material de partida para la purificación del anticuerpo se añadió a una columna, y la columna se lavó con PBS, y después de eso, se realizó la elución con clorhidrato de arginina 2 M, pH 4,0. Después de neutralizar la solución de anticuerpo eluida, el tampón se reemplazó con PBS. La concentración del anticuerpo se obtuvo eluyendo el anticuerpo unido a una Columna PEEK POROS G de 20 µm, 4,6 mm x 50 mm, 0,83 ml (Applied Biosystems, Inc.) y se midió la absorbancia (D.O. 280 nm) del eluato. Específicamente, se añadió una muestra de anticuerpo diluida con PBS a POROS G 20 µm equilibrada con un tampón de equilibrio (dodecahidrato de dihidrogeno fosfato sódico 30,6 mM, fosfato monopotásico 19,5 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,0). Después, la columna se lavó con el tampón de equilibrio, y el anticuerpo unido a la columna se eluyó después con un eluyente (HCl 0,1 % (v/v), NaCl 0,15 M). El área pico de la absorbancia (DO 280 nm) del eluato se midió y la concentración se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: concentración de la muestra de anticuerpo (mg/ml) = (área pico de la muestra de anticuerpo)/(área pico del patrón de referencia (IgG1 humana) x concentración del patrón de referencia (mg/ml) x factor de dilución de la muestra. Además, la concentración de la endotoxina contenida en el anticuerpo obtenido se midió usando el Ensayo Limulus ES-II Single de Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 295-51030 que contenía endotoxina patrón de control) y un toxinómetro (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., ET-301 o ET-5000) y se confirmó que era de 1 UE/mg o menor. El anticuerpo resultante se usó en el experimento posterior.

1) -9 actividad citocida *in vitro* del anticuerpo B273 de ratón contra líneas celulares de cáncer humano

Cada una de una línea celular Jurkat de linfoma T humano y una línea celular de glioblastoma humano U-87MG se preparó a $4,4 \times 10^4$ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % o medio MEM (medio esencial

mínimo) que contenía FBS al 10 % y se añadió a una microplaca de 96 pocillos blancos de fondo transparente (fabricada por Corning Incorporated) a 45 µl/pocillo, y se cultivó durante una noche en las condiciones de temperatura a 37 °C y con CO₂ al 5 %. El anticuerpo B273 de ratón o el anticuerpo IgG1 de ratón (fabricado por R y D Systems, Inc.) se mezcló con la misma concentración de anti Fc de IgG de ratón de cabra AffiniPure específico (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 115-005-071) y la mezcla resultante se añadió a 5 µl/pocillo de tal manera que la concentración final del anticuerpo B273 de ratón o del anticuerpo IgG1 de ratón fuese de 10.000 a 0,01 ng/ml y las células se cultivaron en condiciones de 37 ° y CO₂ al 5 % durante 24 horas. La cantidad de ATP procedente de células viables en cada pocillo se midió con un luminómetro (fabricado por Perkin Elmer, Inc.) usando un kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega Corporation, n.º G7571) de acuerdo con el protocolo adjunto. La actividad citocida se evaluó tomando el valor obtenido del pocillo, al cual se añadió el medio, en lugar de la solución de anticuerpo como 100 % (Figura 1). En cada gráfico, la viabilidad celular se expresó como una media ± desviación típica (n = 3). Como resultado, se descubrió que el anticuerpo B273 de ratón exhibía un efecto citocida en ambas líneas celulares de una manera dependiente de la concentración del anticuerpo.

15 **[Ejemplo 2] Clonación del gen del anticuerpo B273 de ratón y producción del gen del anticuerpo quimérico humano**

2) -1 Clonación del ADNc del anticuerpo B273 de ratón y determinación de secuencia

2) -1-1 Determinación de las secuencias de aminoácidos N-terminal de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo B273 de ratón

20 Para determinar las secuencias de aminoácidos N terminal de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo B273 de ratón, el anticuerpo B273 de ratón purificado en el Ejemplo 1-8 se separó por SDS-PAGE. La proteína en el gel se transfirió desde el gel, después de la separación, a una membrana de PVDF (tamaño de poro: 0,45 µm, fabricada por Invitrogen Corporation). La membrana se lavó con un tampón de lavado (NaCl 25 mM, tampón borato sódico 10 mM pH 8,0) y después de esto se tiñó sumergiéndolo en una solución colorante (metanol al 50 %, ácido acético al 20 % y azul brillante de Coomassie al 0,05 %) durante 5 minutos, seguido de eliminación de la tinción con metanol al 90 %. Las partes de la banda correspondientes a la cadena pesada (la banda con menor movilidad) y la banda correspondiente a la cadena ligera (la banda con mayor movilidad) visualizadas sobre la membrana de PVDF se escindieron y se realizó un intento para identificar sus secuencias de aminoácidos N terminal respectivas mediante un procedimiento Edman automático (véase Edman y col. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80) usando Procise (marca registrada) Modelo 492cLC Secuenciador de Proteína cLC (Applied Biosystems, Inc.). Como resultado, la secuencia de aminoácidos N terminal de la banda correspondiente a la cadena pesada del anticuerpo B273 de ratón fue EVQLQQSGPELVKPG (SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias) y la secuencia de aminoácidos N terminal de la banda correspondiente a la cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón fue DVVMTQTPLSLPVSLGDAQS (SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias).

35 2) -1-2 Preparación de ARNm del hibridoma productor del anticuerpo B273 de ratón

Para clonar los ADNc que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón, respectivamente, se preparó ARNm del hibridoma productor del anticuerpo B273 de ratón usando el Kit de Purificación de ARNm Quick Prep (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Limitado.).

2) -1-3 Clonación del ADNc del anticuerpo B273 de ratón y determinación de secuencias

40 Con referencia a los hallazgos de que los isotipos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo B273 de ratón eran los γ1 y κ encontrados en el Ejemplo 1-7, y a las secuencias de aminoácidos N terminal de las cadenas pesada y ligera determinadas en el apartado 2) -1-1 anterior, y a la base de datos de las secuencias de aminoácidos de anticuerpos preparadas por Kabat y col. (véase Kabat, EA y col., (1991), in Sequences of Proteins of Immunological Interest Vol. I and II, U.S. Department of Health and Human Services), se sintetizaron diversos cebadores oligonucleotídicos que hibridaban con la región 5' terminal de una región que codificaba el gen del anticuerpo y la región 3' terminal del mismo que contenía un codón de terminación, respectivamente, y se amplificó un ADNc que codificaba la cadena pesada y un ADNc que codificaba la cadena ligera usando el ARNm preparado en el apartado 2) -1-2 y el Kit para PCR de ARN de una etapa TaKaRa (AMV) (TaKaRa Bio, Inc.). Como resultado, el ADNc que codificaba la cadena pesada del anticuerpo y el ADNc que codificaba la cadena ligera del anticuerpo pudieron amplificarse mediante los siguientes conjuntos de cebadores.

Un conjunto de cebadores para la cadena pesada

5'-aagaattcatgggatggagctgtatc-3' (MH258E1F1: SEQ ID NO: 3 en el Listado de Secuencias)
5'-aagatatcttattaccaggagagtgaggagag-3' (G1EVR1: SEQ ID NO: 4 en el Listado de Secuencias)

Un conjunto de cebadores para cadena ligera

55 5'-aagaattcatgaagttgcctgttagg-3' (MK19EIF1: SEQ ID NO: 5 en el Listado de Secuencias)
5'-aagatatcttaacactcattctgtgaagct-3' (KEVR1: SEQ ID NO: 6 en el Listado de Secuencias)

5 Cada uno de los ADNc que codificaba la cadena pesada y el ADNc que codificaba la cadena ligera amplificado por PCR se clonó usando el Kit de Expresión pEF6/V5-His TOPO TA (Invitrogen Corporation), y cada una de las secuencias de nucleótidos de la cadena pesada y de la cadena ligera clonada se determinó usando un analizador de secuencias de genes ("ABI PRISM 3700 DNA Analyzer; Applied Biosystems" o "Applied Biosystems 3730xl Analyzer; Applied Biosystems"). En la reacción de secuenciación, se usó GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Inc.).

10 La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la cadena pesada del anticuerpo B273 de ratón se representa por SEQ ID NO: 7 en el Listado de Secuencias y su secuencia de aminoácidos se representa por SEQ ID NO: 8. La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón se representa por SEQ ID NO: 9 en el Listado de Secuencias y su secuencia de aminoácidos se representa por SEQ ID NO: 10 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 7 y 8 se muestran en la Figura 28, y las secuencias de las SEQ ID NO: 9 y 10 se muestran en la Figura 29.

15 Adicionalmente, las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y de la cadena ligera se analizaron por comparación usando KabatMan (véase PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 25 (1996), 130-133), que es la base de datos de las secuencias de aminoácidos de anticuerpos. Como resultado, se descubrió que en la cadena pesada del anticuerpo B273 de ratón, la secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 8 en el Listado de Secuencias es una región variable. También se descubrió que en la cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón, la secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 20 a 133 de SEQ ID NO: 10 en el Listado de Secuencias es una región variable.

2) -2 Producción del vector de expresión del anticuerpo B273 quimérico

20 2) -2-1 Producción de vectores de expresión universales pEF6KCL y pEF1FCCU

2) -2-1-1 Construcción del vector de expresión pEF6KCL de cadena ligera quimérica y humanizada

25 Realizando PCR, usando como molde el plásmido pEF6/V5-HisB (Invitrogen Corporation) y también usando los siguientes cebadores, se obtuvo un fragmento de ADN desde inmediatamente aguas abajo de BGHpA (Posición de Secuencia: 2174) hacia SmaI (Posición de Secuencia: 2958) (un fragmento de ADN que contiene el origen de replicación f1 y el promotor y origen de SV40, en lo sucesivo en el presente documento denominado "fragmento A").

5'-ccacgcgccctgtagcggcgccattaagc-3' (cebador EFF1: SEQ ID NO: 11 en el Listado de Secuencias)

5'-aaacccgggagcttttgcaaaagcctagg-3' (cebador EFsmaR: SEQ ID NO: 12 en el Listado de Secuencias)

30 El fragmento A obtenido y un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 13, en lo sucesivo en el presente documento denominado "fragmento B") que contiene una secuencia de ADN que codifica una señal secretora de cadena κ humana, una región constante de cadena κ humana y una señal adicional poli A humana se ligaron entre sí mediante PCR de extensión solapante. El fragmento de ADN así obtenido, en el que el fragmento A y el fragmento B se ligaron entre sí, se sometió a digestión con las enzimas de restricción KpnI y SmaI, que se ligó con el plásmido pEF6/V5-HisB (Invitrogen Corporation) que se sometió a digestión con las enzimas de restricción KpnI y SmaI, mediante lo cual se construyó un vector de expresión pEF6KCL de cadena ligera quimérica y humanizada que tenía una secuencia de señal, un sitio de clonación, una región constante de cadena κ humana y una secuencia señal adicional poli A humana aguas abajo del promotor EF1.

35 2) -2-1-2 Construcción de pEF1/KCL

40 Un fragmento de ADN obtenido escindiendo el vector pEF6KCL obtenido mediante el procedimiento descrito anteriormente con las enzimas de restricción KpnI y SmaI se ligó con pEF1/myc-HisB (Invitrogen Corporation) que se sometió a digestión con KpnI y SmaI, mediante lo cual se construyó un plásmido pEF1KCL.

2) -2-1-3 Construcción del vector de expresión pEF1FCCU de cadena pesada quimérica y humanizada

45 Un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 14) que contiene una secuencia de ADN que codifica los aminoácidos de una secuencia señal y una región constante de IgG1 humana se sometió a digestión con las enzimas de restricción NheI y PmeI y se ligó con el plásmido pEF1KCL que se sometió a digestión con NheI y PmeI, mediante lo cual se construyó un vector de expresión pEF1FCCU de cadena pesada quimérica y humanizada que tenía una secuencia señal, un sitio de clonación, una región constante de cadena pesada humana y una secuencia señal adicional poli A humana aguas abajo del promotor EF1.

2) -2-2 Construcción del vector de expresión de cadena ligera de tipo quimera de B273

50 Usando como molde el ADNc que codifica la cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón y también usando KOD-Plus-(TOYOBO, Co., Ltd.) y el siguiente conjunto de cebadores, se amplificó una región que contenía el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera. Un fragmento de ADN obtenido escindiendo el producto amplificado con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI se insertó en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo quimérico y humanizado universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI, mediante lo cual se construyó un vector de expresión de cadena ligera de tipo quimera de B273. El vector de

expresión así obtenido se denominó "pEF6KCL/B273L". La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo quimera de B273 se representa por SEQ ID NO: 15 en el Listado de Secuencias y su secuencia de aminoácidos de se representa por SEQ ID NO: 16. Las secuencias de las SEQ ID NO: 15 y 16 se muestran en la Figura 30. Por otro lado, el resto de aminoácido en la posición 134 en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo quimera representada por SEQ ID NO: 16 en el Listado de Secuencias se localiza en el extremo carboxilo de la región variable de cadena ligera y corresponde al resto de alanina en la posición 133 en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón representada por SEQ ID NO: 10 en el listado de secuencias, sin embargo, en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 16, el resto ya se ha sustituido con un resto de treonina procedente de una cadena ligera del anticuerpo humano.

10 Conjunto de cebadores para la cadena ligera:

5'-aaacatatggcgtgtgtgatgacccaaactccactctcc-3' (B273LF: SEQ ID NO: 17 en el Listado de Secuencias)

5'-aacgtacgtttgattccagctgtgctccaccgaacg-3' (B273LR: SEQ ID NO: 18 en el Listado de Secuencias)

2) -2-3 Construcción del vector de expresión de cadena pesada de tipo quimera de B273

15 Usando como el ADNc que codifica la cadena pesada del anticuerpo B273 de ratón y también usando KOD-Plus- (TOYOBO, Co., Ltd.) y el siguiente conjunto de cebadores, se amplificó una región que contenía el ADNc que codifica la región variable de cadena pesada. Un fragmento de ADN obtenido escindiendo el producto amplificado con la enzima de restricción BlnI se insertó en el vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo quimérico y humanizado universal (pEF1FCCU) en el sitio escindido con la enzima de restricción BlnI, mediante lo cual se construyó un vector de expresión de cadena pesada de tipo quimera de B273. El vector de expresión así obtenido se denominó "pEF1FCCU/B273H". La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de tipo quimera de B273 se representa por SEQ ID NO: 19 en el Listado de Secuencias y su secuencia de aminoácidos se representa por SEQ ID NO: 20. Las secuencias de las SEQ ID NO: 19 y 20 se muestran en la Figura 31.

Conjunto de cebadores para la cadena pesada:

25 5'-aaagctgagcggagttcagctgcagcagctggacctgagc-3' (B273HF: SEC ID N°: 21 en el Listado de Secuencias)

5'-aaagctgagctgactgtgagagtgtgctgccccagtag-3' (B273HR: SEC ID N°: 22 en el Listado de Secuencias)

2) -3 Preparación del anticuerpo quimérico B273

2) -3-1 Producción del anticuerpo quimérico B273

30 Se sembraron $1,2 \times 10^9$ células de células FreeStyle 293F (Invitrogen Corporation) en la fase de crecimiento logarítmico en 1,2 l de Medio de Expresión FreeStyle 293 reciente (Invitrogen Corporation) y se cultivaron durante 1 hora agitando a 90 rpm a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. Se disolvieron 3,6 mg de polietilimina (Polyscience n.º 24765) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Posteriormente, pEF1FCCU/B273H (0,4 mg) y pEF6KCL/B273L (0,8 mg) preparados con el Kit para plásmidos PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) se suspendieron en 20 ml de medio Opti-Pro SFM. Después, 20 ml del líquido obtenido con la mezcla de vectores de expresión/Opti-Pro SFM se añadieron a 20 ml del líquido obtenido con la mezcla de polietilimina/Opti-Pro SFM y la mezcla resultante se agitó suavemente y después se dejó reposar durante 5 minutos. Después de esto la mezcla se añadió a las células FreeStyle 293F y el cultivo se realizó agitando a 90 rpm durante 7 días a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. El sobrenadante del cultivo resultante se filtró a través de un filtro de cápsula desechable (Advantec n.º CCS-045-E1H).

40 Un anticuerpo B273 quimérico obtenido por una combinación de pEF1FCCU/B273H y pEF6KCL/B273L se denominó "cB273".

2) -3-2 Purificación de cB273

45 El sobrenadante de cultivo obtenido en el apartado 2) -3-1 anterior se purificó mediante un proceso de dos etapas que incluía cromatografía de afinidad de rProteína A (a una temperatura de 4 a 6 °C) e hidroxapatita de cerámica (a temperatura ambiente). Se realizó una etapa de reemplazo de tampón después de la purificación mediante cromatografía de afinidad de rProteína A y después de la purificación mediante hidroxapatita de cerámica a temperatura ambiente. En primer lugar, 1100 a 1200 ml del sobrenadante de cultivo se aplicaron a MabSelect SURE (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas HiTrap (volumen: 1 ml) conectadas en serie) equilibrado con PBS. Después de verter toda la solución del cultivo en la columna, esta se lavó con 15 a 30 ml de PBS. Posteriormente, la elución se realizó con una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4,0) y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), mediante lo cual el tampón se reemplazó por un tampón que contenía fosfato sódico 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH de 6,5. Posteriormente, la solución del anticuerpo sometida al reemplazo del tampón se aplicó a una columna de hidroxapatita de cerámica (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., Bio-Scale CHT2-1 columna de hidroxapatita (volumen: 2 ml)) equilibrada con un tampón que contenía NaPi 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Después, se realizó una elución en gradiente de concentración lineal con cloruro de sodio y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE

Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), mediante lo cual el líquido se reemplazó por CBS (tampón citrato 10 mM que contenía cloruro de sodio 140 mM, pH 6,0). Finalmente la solución resultante se concentró usando un Dispositivo de filtro Centrifugal UF VIVASPIN 20 (peso molecular fraccional: 30 K, Sartorius Co., Ltd., a 4 °C) y la concentración de IgG se ajustó a 1,0 mg/ml o más, y la solución así obtenida se usó como una muestra purificada.

[Ejemplo 3] Medición de la actividad del anticuerpo quimérico humano B273 (cB273) (in vitro)

3) -1 Estudio de la propiedad de unión selectiva del anticuerpo cB273 con el dominio extracelular de DR5 humano

La propiedad de unión de cB273 con proteínas de dominio extracelular de TRAIL R1 a R4 humano y TRAIL R2 de ratón (fabricado por R y D Systems, Inc.) se estudió mediante un procedimiento de ELISA directo descrito más adelante. En primer lugar, cada una de las proteínas de dominio extracelular de TRAIL Rs se diluyó a 1 µg/ml con PBS y la solución diluida se dispensó a 50 µl/pocillo en una inmunoplaaca (fabricada por Nunc, Inc., n.º 442404) y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C, mediante lo cual la proteína se adsorbió a la placa. Al día siguiente, el líquido de cada pocillo se retiró y cada pocillo se lavó una vez con PBS. Después de esto, para suprimir la adsorción no específica de las proteínas, se dispensó PBS que contenía suero bovino fetal al 3 % a 200 µl/pocillo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El líquido de cada pocillo se retiró y se añadieron a estos cB273 o TRAIL humano soluble (fabricado por ALEXIS Corporation, n.º ALX-522-003) diluido con PBS que contenía suero bovino fetal al 3 % a 50 µl/pocillo. Después de dejar reposar la placa a temperatura ambiente durante 1,5 horas, se añadió PBS a cada pocillo y después se retiró el líquido del pocillo el cual se lavó dos veces con PBS. Después, al pocillo al cual se había añadido el anticuerpo cB273, se añadió anti IgG humana de cabra específico del F(ab')₂, conjugado con peroxidasa (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 109-035-097) diluido 2500 veces con PBS que contenía suero bovino fetal al 3 % a 50 µl/pocillo, y al pocillo al cual se había añadido TRAIL soluble, se añadió el anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 conjugado con peroxidasa diluido 2000 veces a 50 µl/pocillo y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después se añadió PBS a cada pocillo, el líquido se retiró del pocillo y este se lavó dos veces con PBS. Después de esto, se añadió un líquido revelador de color OPD a 100 µl/pocillo, mediante lo cual se reveló un color. Después, se añadió HCl 1 M a 100 µl/pocillo, mediante lo cual en la reacción de revelado de color se detuvo. Después de esto, se midió la absorbancia a 492 nm usando un lector de placa. La Figura 2A muestra los resultados para cB273, y la Figura 2B muestra los resultados para TRAIL soluble. Los datos en los gráficos se expresan mediante una media ± desviación típica (n = 3). Como resultado, se observó que cB273 se unía selectivamente al dominio extracelular de TRAIL R2 humano.

3) -2 Evaluación de la actividad de unión del anticuerpo cB273 usando Biacore

3) -2-1 Preparación de la proteína de dominio extracelular de DR5 humano

3) -2-1-1 Producción del vector de expresión de la proteína del dominio extracelular de DR5

Para construir un vector que expresase una región (en lo sucesivo en el presente documento denominado "sDR5") compuesta por una secuencia de aminoácidos mostrada por los números de aminoácidos 1 a 130 de DR5 humano representada por SEQ ID NO: 23 en el Listado de Secuencias, se realizó una reacción de PCR usando un conjunto de cebadores para amplificar sDR5: DR5 Ndefw: 5'-gtggcatatggctctgatcacccaacaa-3' (SEQ ID NO: 24 en el Listado de Secuencias) y DR5 Xhorv: 5'-cgctcgagtgattcttgggacaca-3' (SEQ ID NO: 25 en el Listado de Secuencias) y también usando como molde un ADNc que codificaba un dominio extracelular de DR5 humano. El producto resultante de la PCR se escindió con NdeI y XhoI y se clonó en el sitio NdeI/XhoI de pET21b(+) (fabricado por Novagen, Inc.) (en lo sucesivo en el presente documento abreviado como "pET21b(+)-sDR5"). Además, una proteína recombinante expresada por "pET21b(+)-sDR5" se denominó "rsDR5" (SEQ ID NO: 26 en el Listado de Secuencias) en lo sucesivo en el presente documento y en los dibujos.

3) -2-1-2 Producción de la proteína de dominio extracelular de DR5 (rsDR5)

Escherichia coli Origami B (DE3) (fabricada por Novagen, Inc.) se transformó con el plásmido de expresión pET21b(+)-sDR5 y se cultivó en medio 2-YT complementado con ampicilina 100 µg/ml (fabricado por Sigma Co., Ltd.) y kanamicina 15 µg/ml (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y se indujo la expresión de una proteína parcial de DR5 por la adición de IPTG 0,5 mM. Las células se recogieron por centrifugación a 6000 rpm durante 20 minutos y se suspendieron en un tampón de unión (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 300 mM), seguido de homogeneización con ultrasonido en hielo. El homogeneizado resultante se centrifugó a 25.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se recuperó y se aplicó a Ni-NTA (fabricado por Invitrogen Corporation). Después de realizar el lavado con el tampón de unión, se realizó la elución con un tampón de elución (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 300 mM e imidazol 300 mM). La muestra eluida se dializó con un tampón de diálisis (Tris-HCl 50mM, pH 8,0, NaCl 20 mM) y se aplicó a Mono Q y se realizó una elución en gradiente con un tampón de elución (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, 1 M NaCl). La muestra eluida se purificó adicionalmente mediante cromatografía de columna con filtración en gel (Superdex 75 16/60, fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) usando PBS como disolvente. La concentración de la proteína recombinante así obtenida se midió a UV 280 nm (constante de absorbancia molar: 14855).

3) -2 Medición de la actividad de unión usando Biacore

La constante de disociación de cada uno del anticuerpo cB273 y rsDR5 se midió usando Biacore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) mediante un procedimiento de captura en el que un anticuerpo se capturó mediante un anticuerpo anti IgG (Fc) humano inmovilizado y la medición se realizó usando un antígeno como un analito. El anticuerpo anti IgG (Fc) humano (Kit de Captura de Anticuerpos Humanos, GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) se inmovilizó de manera covalente sobre una microplaca detectora CM5 (Biacore, Inc.) a aproximadamente 8000 UR mediante un procedimiento de acoplamiento con amina. La inmovilización se realizó también sobre una célula de referencia de la misma manera. Como un tampón de desarrollo, se usó HBS-EP (HEPES 10 pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 a 0,05 %). Sobre la microplaca que tenía el anticuerpo anti IgG (Fc) humano inmovilizado sobre la misma, se añadió una solución de anticuerpo cB273 50 nM a un caudal de 10 μ l/min durante 60 segundos, y después, se añadió una serie de dilución de rsDR5 (0,63-20 nM) a un caudal de 30 μ l/min durante 60 segundos y posteriormente, se monitorizó la fase de disociación durante 300 segundos. Como una solución de regeneración, se añadió cloruro de magnesio 3 M a un caudal de 10 μ l/min durante 30 segundos. En el análisis de los datos, se usó el programa informático de análisis (programa informático BIAevaluation, versión 3.1) con un modelo de unión individualizado y se calculó la constante de velocidad de asociación (kon), la constante de velocidad de disociación (koff) y la constante de disociación (KD; KD = koff/kon). En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos de la medición usando Biacore para el anticuerpo cB273.

3) -3 Efecto citocida *in vitro* del anticuerpo cB273 en líneas celulares de cáncer humano

El efecto citocida del anticuerpo cB273 sobre diversas líneas celulares de cáncer se estudió mediante el siguiente procedimiento. En la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) se adquirieron A2780, SK-OV-3, SK-CO-1, Caov-3 y NIH:OVCAR-5 (todas ellas son líneas celulares de cáncer de ovario humano), HCT-15, COLO 205, HT29, SW480, SW620, DLD-1, COLO 201 y WiDr (todas ellas son líneas celulares de cáncer de colon humano), NCI-H1975, NCI-H292, NCI-H460 y NCI-H358 (todas ellas son líneas celulares de cáncer de pulmón humano), MDA-MB-231 y ZR-75-1 (las dos son líneas celulares de cáncer de mama humano). Cada una de estas líneas celulares se preparó a 1×10^5 células/ml con un medio que contenía suero bovino fetal al 10 % (fabricado por Hyclone Laboratories, Inc.) (en lo sucesivo en el presente documento denominado como "el medio") y se sembraron a 50 μ l/pocillo en una microplaca de 96 pocillos blanca de fondo transparente (fabricada por Corning Incorporated). El anticuerpo cB273 se preparó a 20000 ng/ml con una solución 1 μ g/ml de un anticuerpo secundario (anti IgG Fc humano de cabra, fabricado por MP Biomedicals, LLC.) y después se preparó a 2000, 200, 20 y 2 ng/ml con el medio, y cada una de las soluciones resultantes se añadió a la placa a 50 μ l/pocillo (la concentración final del anticuerpo: 10000, 1000, 100, 10, y 1 ng/ml). Después, de incubar la placa en condiciones de 37 °C y con CO₂ al 5 % durante 72 horas, en cada pocillo se midió la cantidad de ATP procedente de células viables, usando un kit de Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega Corporation, n.º G7571) con un luminómetro (fabricado por Berthold Technologies) de acuerdo con el protocolo adjunto. Un pocillo al cual se añadió el medio y la suspensión celular se preparó como un pocillo de control negativo y un pocillo al cual solo se añadió el medio se preparó como un pocillo de fondo, y se calculó la viabilidad celular en cada pocillo de ensayo. En la Figura 4, se muestra una media \pm desviación típica (n = 3) de la viabilidad celular para cada línea celular de cáncer tratada con el anticuerpo cB273. El anticuerpo cB273 exhibió una actividad citocida contra las líneas celulares excepto contra la de SK-CO-1

Se estudió un efecto citocida *in vitro* sobre diversas líneas celulares de cáncer usando, como objeto del ensayo, BxPC-3 y MIA PaCa-2 (ambas de ellas líneas celulares de cáncer pancreático humano), A2058 y A375 (ambas de ellas son líneas celulares de melanoma humano), U-87MG (una línea celular de glioblastoma humano), AN3CA (una línea celular de cáncer endometrial humano). Cada una de estas líneas celulares se preparó a $4,4 \times 10^4$ células/ml con un medio que contenía FBS al 10 % y se añadió a 45 μ l/pocillo en una microplaca de 96 pocillos blanca de fondo transparente (fabricada por Corning Incorporated), y la placa se incubó durante una noche en condiciones de 37 °C y con CO₂ al 5 %. El anticuerpo cB273 se mezcló con la misma concentración de anti IgG Fc humano de cabra (fabricado por MP Biomedicals, LLC.) y después la mezcla resultante se añadió a la placa a 5 μ l/pocillo de tal manera que la concentración final del anticuerpo cB273 fuera de 10.000 a 1 ng/ml, y la placa se incubó a 37 °C y con CO₂ al 5 % durante 24 horas. La cantidad de ATP procedente de células viables en cada pocillo se midió usando un Kit de Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega Corporation, n.º G7571) con un luminómetro (fabricado por Perkin Elmer Inc.) de acuerdo con el protocolo adjunto. Cada gráfico muestra la viabilidad celular expresada por la media \pm desviación típica (n = 3). Como resultado, el anticuerpo cB273 exhibió un efecto citocida en todas las líneas celulares de cáncer estudiadas (Fig. 5).

[Ejemplo 4] Identificación del epítipo del anticuerpo cB273 4) -1 Producción del fragmento Fab de cB273

El anticuerpo /cB273 se dializó con PBS y después se diluyó a 2 mg/ml con PBS y se preparó a un volumen final de 17 ml. A esto, se añadió cisteína (fabricada por Sigma Co., Ltd.) preparada a 0,1 mM con PBS en una cantidad de 1,7 ml y papaína (fabricada por Sigma Co., Ltd.) diluida a 0,1 mg/ml con PBS en una cantidad de 2,04 ml y se dejó continuar la reacción a 37 °C durante 5 horas, después las cuales, a esto se le añadió N-etilmaleimida (fabricada por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) disuelta a 120 mM en PBS en una cantidad de 6,33 ml para detener la reacción. La solución de reacción se añadió a Superdex 200 26/60 (fabricado por GE Healthcare, Co., Ltd.) equilibrado con Tris-HCl 50 mM que contenía NaCl 20 mM, y se recogieron 14 ml de una fracción correspondiente al fragmento Fab.

4)-2 Preparación de la muestra del complejo fragmento Fab de cB273 - rsDR5

El fragmento Fab de cB273 se concentró a 9,46 mg/ml usando Amicon Ultra-15 (MWCO: 10 K) (fabricado por Millipore Co., Ltd.) y 2 ml del fragmento Fab de cB273 así concentrado se mezcló con 2 ml de rsDR5 concentrado a 5,6 mg/ml usando Amicon Ultra-15 (MWCO: 3 K) y la mezcla resultante se añadió a Superdex 200 16/60 equilibrado con Tris-HCl 20 mM que contenía NaCl 50 mM.

Se recogieron 8 ml de una fracción correspondiente al complejo.

4) -3 Cristalización y análisis estructural del complejo fragmento Fab de cB273 - rsDR5

El complejo Fab cB273-rsDR5 así obtenido se concentró a 25 mg/ml, que se usó para la cristalización. Para la cristalización, se usó un procedimiento de difusión con vapor. Una solución obtenida añadiendo una misma cantidad de una solución precipitante (polietilenglicol 4000 del 6 al 8 % (p/v), isopropanol al 20% (v/v), cloruro de litio 0,1 M, tampón citrato 0,1 M (pH 5,6)) de 0,45 a 1,0 μ l de una solución proteica se colocó en un envase hermético al aire, en el que ya se habían puesto 0,45 ml de la solución precipitante, de tal manera que ambas soluciones no se habían puesto en contacto entre sí y el recipiente se dejó en reposo a una temperatura de 22 °C. Después de 3 días, se obtuvo un cristal en forma de placa (0,4 mm x 0,3 mm x 0,03 mm).

El cristal así obtenido se sumergió en la solución precipitante complementada con glicerol al 30 % (v/v), y después se congeló en una corriente con nitrógeno a -180 °C. Se recogieron datos de difracción de rayos X en una corriente de nitrógeno a 95 K en BL17A en la Photon Factory of the Institute of Materials Structure Science in the High Energy Accelerator Research Organization. A partir de la imagen de difracción obtenida, se cuantificó una intensidad de difracción usando el programa informático HKL-2000 (producido por HKL Research, Inc.), y se calcularon los factores de la estructura cristalina. El cristal obtenido pertenecía al sistema monoclinico, el grupo de simetría espacial fue C2 y el cristal tenía los parámetros unitarios celulares: $a = 152,0 \text{ \AA}$, $b = 75,5 \text{ \AA}$, $c = 116,3 \text{ \AA}$, y $\beta = 110,2$.

Se realizó un procedimiento de reemplazo molecular usando los factores de estructura obtenidos de este modo y se determinaron las coordenadas de la estructura tridimensional de DR5 (código PDB: 2H9G) y de Herceptina Fab (código PDB: 1N8Z) y las fases. En el cálculo, se usó un programa informático Phaser (CCP4: Collaborative Computational Project n.º 4). El cristal contenía dos complejos en la unidad asimétrica.

La estructura se refinó usando el programa informático CNX (Accerlys Inc.), y el modelo se corrigió usando el programa informático Coot. Este procedimiento se repitió, y se obtuvo un valor R final de 25,0 % y un valor R libre de 28,7 % a una resolución de 2,1 Å. El modelo final estaba compuesto por dos complejos y contenía los restos de aminoácidos 1 a 218 de la cadena L de Fab de cB273 (ambas moléculas), los restos de aminoácidos 1 a 222 de la cadena H (ambas moléculas), los restos de aminoácidos 18 a 92 y 98 a 127 de una molécula de DR5 entre las dos moléculas, los restos de aminoácidos 21 a 92 y 98 a 127 de la otra molécula de DR5 y 324 moléculas de agua. No se observó densidad electrónica clara para los restos de aminoácidos 93 a 97 de DR5, los restos 17 o 20 en el extremo N de DR5, 6 restos y una etiqueta de His en el extremo C de DR5, un resto en el extremo C de la cadena L de Fab de cB273 y 5 restos en el extremo C de la cadena H de Fab de cB273, y por lo tanto, no se construyó un modelo. El modelo se validó mediante una representación gráfica de Ramachandran y se descubrió que sólo la Val 56 de la cadena L estaba localizada fuera de la región permitida y que este aminoácido, Val 56, tenía una estructura característica de CDR L2.

Las interacciones determinadas entre el DR5 y el Fab de cB273 eran sustancialmente iguales en las dos moléculas en la unidad asimétrica. Los restos de aminoácidos (la posición de cada resto de aminoácido corresponde a la de SEQ ID NO: 23) de DR5 que se encontraban a una distancia de 4 Å o menor desde el Fab de cB273 eran los siguientes: Gly26, Ile34, Glu36, Asp37, Gly38, Asp56, Leu57, Leu58, Phe59, Leu61 y Arg62. La Figura 6 muestra un modelo de cinta de todo el complejo y de su superficie y la Figura 7 muestra la interacción entre el DR5 y la cadena H o L del Fab de cB273.

[Ejemplo 5] Humanización del anticuerpo cB273 (1)

5) -1 Diseño de B273 humanizado (hB273)

5) -1-1 Modelado molecular de las regiones variables de B273

El modelado molecular de las regiones variables de B273 se realizó de acuerdo con un procedimiento en general conocido como modelado de homología (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Las secuencias primarias (estructuras tridimensionales procedentes de las estructuras cristalinas de rayos X disponibles) de las regiones variables de la inmunoglobulina humana registradas en el Banco de Datos de Proteínas (Nuc. Acid Res. 28, 235-242 (2000)) se compararon con las regiones variables de B273 determinadas anteriormente. Como resultado, se seleccionó 1T66 como una secuencia que tenía la homología de secuencia más alta con la región variable de cadena ligera de B273. Adicionalmente, se seleccionó 1XIW como una secuencia que tenía la secuencia de homología más alta con la región variable de cadena pesada de B273. La estructura tridimensional de una región marco conservada se preparó basándose en un "modelo estructural" combinando las coordenadas de 1T66 y 1XIW correspondientes a la cadena ligera y cadena pesada de B273. Para las CDR, CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1 y

CDRH2 de B273 se asignaron los grupos de 16A, 7A, 9A, 10A, y 10A, respectivamente, de acuerdo con la clasificación de Thornton y col. (J. Mol. Biol., 263, 800-815, (1996)). La CDRH3 se clasificó en k(11) - de acuerdo con las normas H3 (FEBS letters 399, 1-8 (1996)). Posteriormente, la confirmación representativa de cada CDR se incorporó en el modelo estructural.

- 5 Finalmente, para obtener un posible modelo molecular de la región variable de B273 en cuanto a energía, se realizó un cálculo de energía excluyendo contactos interatómicos desfavorables. El procedimiento anterior se llevó a cabo usando el programa de predicción de estructura terciaria de proteínas Prime, disponible en el comercio, y un programa de búsquedas coordinado MacroModel (Schrödinger, LLC).

5)-1-2 Diseño de la secuencia de aminoácidos de B273 humanizado

- 10 Se construyó un anticuerpo B273 humanizado de acuerdo con un procedimiento en general conocido como injerto de CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Se seleccionó un anticuerpo aceptor basándose en la homología de aminoácidos dentro de la región marco conservada.

- 15 La secuencia de la región marcoconservada de B273 se comparó con todas las secuencias marco conservadas humanas de la base de datos de Kabat (Nuc. Acid Res. 29, 205-206 (2001)) de secuencias de aminoácidos de anticuerpos. Como resultado, se seleccionó un anticuerpo HuMc3 como un aceptor basándose en una homología de secuencia del 76 % en la región marcoconservada. Los restos de aminoácidos en la región marco conservada de HuMc3 se alinearon con los restos de aminoácidos de B273, y se identificaron las posiciones donde se utilizaban diferentes aminoácidos. Las posiciones de estos restos se analizaron usando el modelo tridimensional de B273 construido anteriormente. Después, los restos donadores a injertar sobre el aceptor se seleccionaron de acuerdo con los criterios proporcionados por Queen y col., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)).

- 20 Transfiriendo algunos restos donadores seleccionados al anticuerpo aceptor, se construyeron secuencias de B273 humanizado como se describe en el siguiente Ejemplo.

5)-1-2 Humanización de la cadena ligera de B273

5)-1-2-1 cadena ligera de tipo hB273_L1:

- 25 Una cadena ligera de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 22 (valina), 27 (treonina), 34 (serina), 35 (leucina), 37 (ácido aspártico), 38 (glutamina), 70 (lisina), 108 (leucina), 110 (isoleucina), 112 (fenilalanina), 125 (glicina) y 129 (leucina) de la cadena ligera de cB273, representada por SEQ ID NO: 16 en el Listado de Secuencias, por isoleucina, serina, treonina, prolina, ácido glutámico, prolina, glutamina, valina, valina, tirosina, prolina y valina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo hB273_L1".

- 30 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hB273_L1 se representa por SEQ ID NO: 27 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1 se representa por SEQ ID NO: 28 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 27 y 28 también se muestran en la Figura 32.

5)-1-2-2 cadena ligera de tipo hB273_L2:

- 35 Una cadena ligera de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 37 (ácido aspártico), 38 (glutamina), 108 (leucina), 110 (isoleucina), 125 (glicina) y 129 (leucina) de la cadena ligera de cB273, representada por SEQ ID NO: 16 en el Listado de Secuencias, por ácido glutámico, prolina, valina, valina, prolina y valina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo hB273_L2".

- 40 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hB273_L2 se representa por SEQ ID NO: 29 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L2 se representa por SEQ ID NO: 30 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 29 y 30 también se muestran en la Figura 33.

5)-1-2-3 cadena ligera de tipo hB273_L3:

- 45 Una cadena ligera de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 37 (ácido aspártico), 38 (glutamina), 108 (leucina), 110 (isoleucina), y 129 (leucina) de la cadena ligera de cB273, representada por SEQ ID NO: 16 en el Listado de Secuencias, por ácido glutámico, prolina, valina, valina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena ligera de tipo hB273_L3".

- 50 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hB273_L3 se representa por SEQ ID NO: 31 en el Listado de Secuencias. Además, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L3 se representa por SEQ ID NO: 32 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 31 y 32 también se muestran en la Figura 34.

5)-1-3 Humanización de la cadena pesada de B273

5)-1-3-1 cadena pesada de tipo hB273_H1:

Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 56 (metionina), 57 (lisina), 59 (serina), 60 (histidina), 62 (lisina), 63 (serina), 67 (isoleucina), 86 (lisina), 87 (alanina), 95 (serina), 96 (treonina), 99 (histidina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 114 (fenilalanina), 116 (glicina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEC ID NO: 20 en el listado de secuencias, por glutamina, valina, alanina, valina, lisina, valina, valina, arginina, alanina, prolina, metionina, glicina, metionina, arginina, valina, treonina, serina, tirosina, serina, arginina, treonina, tirosina, alanina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo hB273_H1".

Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H1 se representa por SEQ ID NO: 33 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H1 se representa por SEQ ID NO: 34 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 33 y 34 también se muestran en la Figura 35.

15) 5)-1-3-2 cadena pesada de tipo hB273_H2:

Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 60 (histidina), 62 (lisina), 95 (serina), 96 (treonina), 99 (histidina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 116 (glicina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada cB273, representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, por glutamina, valina, alanina, valina, lisina, valina, prolina, metionina, treonina, serina, tirosina, serina, arginina, treonina, alanina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo hB273_H2".

Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H2 se representa por SEQ ID NO: 35 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2 se representa por SEQ ID NO: 36 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 35 y 36 también se muestran en la Figura 36.

5)-1-3-3 cadena pesada de tipo hB273_H3:

Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 60 (histidina), 95 (serina), 96 (treonina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, por valina, alanina, valina, lisina, valina, prolina, treonina, serina, serina, arginina, treonina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo hB273_H3".

Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H3 se representa por SEQ ID NO: 37 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H3 se representa por SEQ ID NO: 38 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de la SEQ ID NO: 37 y 38 también se muestran en la Figura 37.

5)-2 Construcción de vectores de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1, hB273_L2 y hB273_L3

Los ADN que contenían un gen que codificaba una región variable de cadena ligera de tipo hB273_L1, hB273_L2 o hB273_L3 representada por los números de aminoácidos 21 a 134 de SEQ ID NO: 28, los números de aminoácidos 21 a 134 de SEQ ID NO: 30 o los números de aminoácidos 21 a 134 de SEQ ID NO: 32 se sintetizaron (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service). Después, cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos por escisión de los ADN sintetizados con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI se insertaron en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo humanizado universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI, por lo cual se construyeron los vectores de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1, hB273_L2 y hB273_L3. Los vectores de expresión obtenidos de esta manera se denominaron "pEF6KCL/hB273_L1", "pEF6KCL/hB273_L2" y "pEF6KCL/hB273_L3", respectivamente.

5)-3 Construcción de vectores de expresión de cadena pesada de tipo hB273_H1, hB273_H2 y hB273_H3

Los ADN que contenían un gen que codificaba una región variable de cadena pesada de tipo hB273_H1, hB273_H2 o hB273_H3 representada por los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 34 en el Listado de Secuencias, los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 36 o los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 38 se sintetizaron (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service). Después, cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos por escisión de los ADN sintetizados con la enzima de restricción BlnI se insertaron en el vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo humanizado universal (pEF1FCCU) en el sitio escindido con la enzima de restricción BlnI, por lo cual se construyeron los vectores de expresión de cadena pesada de tipo hB273_H1, hB273_H2 y hB273_H3. Los vectores de expresión obtenidos de esta manera se denominaron "pEF1FCCU/hB273_H1", "pEF1FCCU/hB273_H2" y "pEF1FCCU/hB273_H3", respectivamente.

5)-4 Preparación de anticuerpos humanizados

5)-4-1 Producción de anticuerpos humanizados

Se sembraron $1,2 \times 10^9$ células de células FreeStyle 293F (Invitrogen Corporation) en la fase de crecimiento logarítmico en 1,2 l de Medio de Expresión FreeStyle 293 reciente (Invitrogen Corporation) y se cultivaron durante 1 hora agitando a 90 rpm a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. Se disolvieron 3,6 mg de polietilimina (Polyscience n.º 24765) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Posteriormente, un vector de expresión de cadena pesada (0,4 mg) y un vector de expresión de cadena ligera (0,8 mg) preparados con el Kit para plásmidos PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) se suspendieron en 20 ml de medio Opti-Pro SFM. Después, 20 ml del líquido obtenido con la mezcla de vectores de expresión/Opti-Pro SFM se añadieron a 20 ml del líquido obtenido con la mezcla de polietilimina/Opti-Pro SFM y la mezcla resultante se agitó suavemente y después se dejó reposar durante 5 minutos. Después de esto la mezcla se añadió a las células FreeStyle 293F Después de 3 horas, a esto se le añadió Z-VAD-FMK (Peptide Institute, Inc.) a una concentración final de 10 µM y el cultivo se realizó agitando a 90 rpm durante 7 días a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. El sobrenadante del cultivo resultante se filtró a través de un filtro de cápsula desechable (Advantec n.º CCS-045-E1H).

Un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H1 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H1/hB273_L1", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273-H1 y pEF6KCL/hB273_L2 se denominó "hB273_H1/hB273_L2", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H1 y pEF6KCL/hB273_L3 se denominó "hB273_H1/hB273_L3", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H2/hB273_L1", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2 y pEF6KCL/hB273_L2 se denominó "hB273_H2/hB273_L2", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2 y pEF6KCL/hB273_L3 se denominó "hB273_H2/hB273_L3", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H3 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H3/hB273_L1", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H3 y pEF6KCL/hB273_L2 se denominó "hB273_H3/hB273_L2" y un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H3 y pEF6KCL/hB273_L3 se denominó "hB273_H3/hB273_L3".

5)-4-2 Purificación de anticuerpos humanizados

El sobrenadante del cultivo obtenido en el apartado 5)-4-1 anterior se purificó mediante un proceso en dos etapas que incluía una cromatografía de afinidad de rProteína A (de 4 a 6 °C) e hidroxapatita de cerámica (a temperatura ambiente). Se realizó una etapa de reemplazo de tampón después de la purificación mediante cromatografía de afinidad de rProteína A y después de la purificación con hidroxapatita de cerámica a temperatura ambiente. En primer lugar, se aplicaron 1100 a 1200 ml de sobrenadante del cultivo a MabSelect SURE (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas HiTrap (volumen: 1 ml) conectadas en serie) equilibrada con PBS. Después de verter toda la solución del cultivo en la columna, la columna se lavó con 15 a 30 ml de PBS. Posteriormente, se realizó la elución con una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4,0), y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), por lo cual el tampón se reemplazó con un tampón que contenía fosfato sódico 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Después, la solución de anticuerpo sometida a reemplazo de tampón se aplicó a una columna de hidroxapatita cerámica (Japón Bio-Rad Laboratories, Inc., Bio-Scale columna de hidroxapatita CHT2-1 (volumen: 2 ml)) equilibrada con un tampón que contenía NaPi 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Después, se realizó una elución en gradiente de concentración lineal con cloruro de sodio y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), por lo cual el líquido se reemplazó con CBS (tampón citrato 10 mM que contenía cloruro sódico 140 mM, pH 6,0). Finalmente, la solución resultante se concentró usando un Dispositivo de Filtro Centrifuga UF VIVASPIN 20 (peso molecular fraccional: 30 K, Sartorius Co., Ltd., a 4 °C) y la concentración de IgG se ajustó a 1,0 mg/ml o más, y la solución así obtenida se usó como una muestra purificada.

[Ejemplo 6] Medición de la actividad del anticuerpo B273 humanizado (hB273) (1)

6)-1 Evaluación de la actividad de unión del anticuerpo hB273 usando Biacore

La constante de disociación de cada uno de los anticuerpos anti-DR5 humanizados y rsDR5 se midió usando Biacore T100 (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) mediante un procedimiento de captura en el que un anticuerpo se captura mediante un anticuerpo anti IgG (Fc) humano inmovilizado y la medición se realiza usando, como analito, un antígeno. El anticuerpo anti IgG (Fc) humano (Kit de Captura de Anticuerpo Humano, GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) se inmovilizó de manera covalente sobre una microplaca detectora CM5 (BIAcore, Inc.) a aproximadamente 10.000 UR mediante un procedimiento de acoplamiento con amina. La inmovilización también se realizó sobre una célula de referencia de la misma manera. Como tampón de desarrollo, se usó HBS-EP (HEPES 10

mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,05 %). Sobre la microplaca que tenía el anticuerpo anti IgG (Fc) humano inmovilizado en su interior, se añadió una solución de anticuerpo de aproximadamente 20 nM a un caudal de 10 µl/min durante 60 segundos y después, se añadió una serie en dilución de rsDR5 (3,13-50 nM) a un caudal de 30 µl/min durante 120 segundos, y posteriormente, la fase de disociación se monitorizó durante 180 segundos. Se añadió cloruro de magnesio 3 M como una solución de regeneración, a un caudal de 10 µl/min durante 30 segundos. En el análisis de los datos, se usó un programa de análisis (programa informático de evaluación Biacore T100, versión 2.0.1) con un modelo de unión individualizado y se calculó la constante de velocidad de asociación (kon), la constante de velocidad de disociación (koff) y la constante de disociación (KD; KD = koff/kon). En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos de la medición usando Biacore para los 9 tipos de anticuerpos DR5 humanizados.

6)-2 Actividad citocida *in vitro* del anticuerpo hB273 contra líneas celulares de cáncer humano

El fragmento F(ab')₂ de cabra AffiniPure anti IgG humana específico del fragmento Fc (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 109-006-098) preparado a 50 µg/ml con Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) se dispensó a 45 µl/pocillo en una microplaca de 96 pocillos (fabricada por Corning Incorporated), y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después de lavar cada pocillo dos veces con PBS, se añadió el sobrenadante del cultivo de 293F que había permitido producir el anticuerpo en el apartado 5)-4-1, el anticuerpo cB273 purificado (Ejemplo 2-3-2), o IgG humana disponible en el comercio (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 009-000-003) a 50 µl/pocillo de tal manera que la concentración final del anticuerpo fuera de 150 a 1,5 ng/ml, y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después de lavar cada pocillo dos veces con PBS, se añadieron células Jurkat preparadas a 4,0 x 10⁴ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % a 50 µl/pocillo y se cultivaron en las condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % durante 23 horas. La cantidad de ATP procedente de las células viables se determinó cuantitativamente usando un kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega Corporation, n.º G7571), y se evaluó el efecto citocida de cada uno de los anticuerpos hB273 tomando como 100 % el valor obtenido de un pocillo en el que se añadió el medio en lugar de la solución de anticuerpo. Como resultado, como se muestra en la Figura 9, con respecto a la humanización de la cadena pesada de B273, se observó una tendencia de que los anticuerpos que comprendían la cadena pesada de tipo H1 mostraban un efecto citocida ligeramente más bajo que los anticuerpos que comprendían la cadena pesada de tipo H2 o H3. Por otro lado, con respecto a la humanización de la cadena ligera de B273, se descubrió que los anticuerpos que comprendían cualquiera de las cadenas ligeras diseñadas de tipo L1, L2 y L3 podían exhibir sustancialmente el mismo efecto citocida.

[Ejemplo 7] Humanización del anticuerpo cB273 (2)

7)-1 Diseño de B273 humanizado (hB273)

7)-1-1 Diseño de la secuencia de aminoácidos de B273 humanizado

Basándose en los resultados del diseño de los anticuerpos humanizados (1) mostrado en los Ejemplos 5 y 6, transfiriendo algunos restos donadores al anticuerpo aceptor, se construyeron secuencias B273 humanizadas como se describe en el siguiente Ejemplo.

7)-1-2 Diseño de la secuencia de aminoácidos de B273 humanizado

7)-1-2-1 cadena pesada de tipo hB273_H1-1:

Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 57 (lisina), 59 (serina), 60 (histidina), 62 (lisina), 63 (serina), 67 (isoleucina), 86 (lisina), 87 (alanina), 95 (serina), 96 (treonina), 99 (histidina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEQ ID NO: 20 del Listado de Secuencias, por glutamina, valina, alanina, valina, lisina, valina, arginina, alanina, prolina, metionina, glicina, metionina, arginina, valina, treonina, serina, tirosina, serina, arginina, treonina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo hB273_H1-1".

Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H1-1 se representa por SEQ ID NO: 39 en el Listado de Secuencias. Además, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H1-1 se representa por SEQ ID NO: 40 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 39 y 40 también se muestran en la Figura 38.

7)-1-2-2 cadena pesada de tipo hB273_H2-1:

Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 60 (histidina), 62 (lisina), 95 (serina), 96 (treonina), 99 (histidina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 116 (glicina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, por valina, alanina, valina, lisina, valina, prolina, metionina, treonina, serina, tirosina, serina, arginina, treonina, alanina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo hB273_H2-1".

Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H2-1 se representa por SEQ ID NO: 41 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-1 se representa por SEQ ID NO: 42 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 41 y 42 también se muestran en la Figura 39.

5 7)-1-2-3 cadena pesada de tipo hB273_H2-2:

Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 60 (histidina), 62 (lisina), 95 (serina), 96 (treonina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 116 (glicina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, por glutamina, valina, alanina, valina, lisina, valina, prolina, metionina, treonina, serina, serina, arginina, treonina, alanina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo hB273_H2-2".

10 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H2-2 se representa por SEQ ID NO: 43 en el Listado de Secuencias. Además, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-2 se representa por SEQ ID NO: 44 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 43 y 44 también se muestran en la Figura 40.

15 7)-1-2-4 cadena pesada de tipo hB273_H2-3:

Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 60 (histidina), 62 (lisina), 95 (serina), 96 (treonina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 116 (glicina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, por valina, alanina, valina, lisina, valina, prolina, metionina, treonina, serina, serina, arginina, treonina, alanina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo hB273_H2-3".

20 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H2-3 se representa por SEQ ID NO: 45 en el Listado de Secuencias. Además, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-3 se representa por SEQ ID NO: 46 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 45 y 46 también se muestran en la Figura 41.

25 7)-1-2-5 cadena pesada de tipo hB273_H2-4:

Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 60 (histidina), 62 (lisina), 95 (serina), 96 (treonina), 99 (histidina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, por glutamina, valina, alanina, valina, lisina, valina, prolina, metionina, treonina, serina, tirosina, serina, arginina, treonina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo hB273_H2-4".

30 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H2-4 se representa por SEQ ID NO: 47 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-4 se representa por SEQ ID NO: 48 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de SEQ ID NO: 47 y 48 también se muestran en la Figura 42.

35 7)-1-2-6 cadena pesada de tipo hB273_H2-5:

Una cadena pesada de B273 humanizado diseñada sustituyendo los números de aminoácidos 20 (ácido glutámico), 24 (glutamina), 28 (prolina), 30 (leucina), 31 (valina), 39 (isoleucina), 60 (histidina), 95 (serina), 96 (treonina), 99 (histidina), 103 (leucina), 106 (treonina), 110 (serina), 136 (treonina) y 137 (leucina) de la cadena pesada de cB273, representada por SEQ ID NO: 20 en el Listado de Secuencias, por glutamina, valina, alanina, valina, lisina, valina, prolina, treonina, serina, tirosina, serina, arginina, treonina, leucina, y valina, respectivamente, se denominó "cadena pesada de tipo hB273_H2-5".

40 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H2-5 se representa por SEQ ID NO: 49 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-5 se representa por SEQ ID NO: 50 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de SEQ ID NO: 49 y 50 también se muestran en la Figura 43.

45 7)-2 Construcción de vectores de expresión de cadena pesada de tipo hB273_H1-1, hB273_H2-1, hB273_H2-2, hB273_H2-3, hB273_H2-4 y hB273_H2-5

Los ADN que contenían un gen que codificaba una región variable de cadena pesada de tipo hB273_H1-1, hB273_H2-1, hB273_H2-2, hB273_H2-3, hB273_H2-4 o hB273_H2-5 representada por los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 40 en el Listado de Secuencias, los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 42, los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 44, los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 46,

los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 48 o los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 50 se sintetizaron (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service). Después, cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos mediante escisión de los ADN sintetizados con la enzima de restricción BlnI se insertaron en el vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo humanizado universal (pEF1FCCU) en el sitio escindido con la enzima de restricción BlnI, por lo que se construyeron los vectores de expresión de cadena pesada de tipo hB273_H1-1, hB273_H2-1, hB273_H2-2, hB273_H2-3, hB273_H2-4 y hB273_H2-5. Los vectores de expresión así obtenidos se denominaron "pEF1FCCU/hB273_H1-1", "pEF1FCCU/hB273_H2-1", "pEF1FCCU/hB273_H2-2", "pEF1FCCU/hB273_H2-3", "pEF1FCCU/hB273_H2-4" y "pEF1FCCU/hB273_H2-5", respectivamente.

7)-3 Preparación de anticuerpos humanizados

10 7)-3-1 Producción de anticuerpos humanizados

Se sembraron $1,2 \times 10^9$ células de células FreeStyle 293F (Invitrogen Corporation) en la fase de crecimiento logarítmico en 1,2 l de Medio de Expresión FreeStyle 293 reciente (Invitrogen Corporation) y se cultivaron durante 1 hora agitando a 90 rpm a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. Se disolvieron 3,6 mg de polietilimina (Polyscience n.º 24765) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Posteriormente, un vector de expresión de cadena pesada (0,4 mg) y un vector de expresión de cadena ligera (0,8 mg) preparados con el Kit para plásmidos PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) se suspendieron en 20 ml de medio Opti-Pro SFM. Después, 20 ml del líquido obtenido con la mezcla de vectores de expresión/Opti-Pro SFM se añadieron a 20 ml del líquido obtenido con la mezcla de polietilimina/Opti-Pro SFM y la mezcla resultante se agitó suavemente y después se dejó reposar durante 5 minutos. Después de esto la mezcla se añadió a las células FreeStyle 293F Después de 3 horas, a esto se le añadió Z-VAD-FMK (Peptide Institute, Inc.) a una concentración final de 10 µM y el cultivo se realizó agitando a 90 rpm durante 7 días a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. El sobrenadante del cultivo resultante se filtró a través de un filtro de cápsula desechable (Advantec n.º CCS-045-E1H).

Un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido mediante una combinación de pEF1FCCU/hB273_H1-1 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H1-1/hB273_L1", un anticuerpo humanizado de cB273 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-1 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H2-1/hB273_L1", un anticuerpo humanizado de cB273 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-2 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H2-2/hB273_L1", un anticuerpo humanizado de cB273 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-3 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H2-3/hB273_L1", un anticuerpo humanizado de cB273 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-4 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H2-4/hB273_L1", y un anticuerpo humanizado de cB273 obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-5 y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H2-5/hB273_L1".

7)-3-2 Purificación de anticuerpos humanizados

El sobrenadante del cultivo obtenido en el apartado 7)-3-1 anterior se purificó mediante un proceso en dos etapas que incluía una cromatografía de afinidad de rProteína A (de 4 a 6 °C) e hidroxapatita de cerámica (a temperatura ambiente). Se realizó una etapa de reemplazo de tampón después de la purificación mediante cromatografía de afinidad de rProteína A y después de la purificación con hidroxapatita de cerámica a temperatura ambiente. En primer lugar, se aplicaron 1100 a 1200 ml de sobrenadante del cultivo a MabSelect SURE (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas HiTrap (volumen: 1 ml) conectadas en serie) equilibrada con PBS. Después de verter toda la solución del cultivo en la columna, la columna se lavó con 15 a 30 ml de PBS. Posteriormente, se realizó la elución con una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4,0), y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), por lo cual el tampón se reemplazó con un tampón que contenía fosfato sódico 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Después, la solución de anticuerpo sometida a reemplazo de tampón se aplicó a una columna de hidroxapatita cerámica (Japón Bio-Rad Laboratories, Inc., Bio-Scale columna de hidroxapatita CHT2-1 (volumen: 2 ml)) equilibrada con un tampón que contenía NaPi 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Después, se realizó una elución en gradiente de concentración lineal con cloruro de sodio y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), por lo cual el líquido se reemplazó con CBS (tampón citrato 10 mM que contenía cloruro sódico 140 mM, pH 6,0). Finalmente, la solución resultante se concentró usando un Dispositivo de Filtro Centrifuga UF VIVASPIN 20 (peso molecular fraccional: 30 K, Sartorius Co., Ltd., a 4 °C) y la concentración de IgG se ajustó a 1,0 mg/ml o más, y la solución así obtenida se usó como una muestra purificada.

[Ejemplo 8] Medición de la actividad del anticuerpo B273 humanizado (hB273) (2)

55 8)-1 Evaluación de la actividad de unión del anticuerpo hB273 usando Biacore

La constante de disociación de cada uno de los anticuerpos anti-DR5 humanizados y rsDR5 se midió usando Biacore T100 (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) mediante un procedimiento de captura en el cual un anticuerpo se capturó mediante un anticuerpo anti-IgG (Fc) humano inmovilizado y la medición se realizó usando un anticuerpo

como analito. El anticuerpo anti IgG (Fc) humano (Kit de Captura de Anticuerpo Humano, GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) se inmovilizó de manera covalente sobre una microplaca detectora CM5 (BIAcore, Inc.) a aproximadamente 10.000 UR mediante un procedimiento de acoplamiento con amina. La inmovilización también se realizó sobre una célula de referencia de la misma manera. Como un tampón de desarrollo, se usó HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y tensoactivo P20 al 0,05 %). Sobre la microplaca que tenía el anticuerpo anti IgG (Fc) humano inmovilizado en su interior, se añadió una solución de anticuerpo a aproximadamente 20 nM a un caudal de 10 µl/min durante 60 segundos y después, se añadió una serie de dilución de rsDR5 (3,13-50 nM) a un caudal de 30 µl/min durante 120 segundos, y posteriormente, la fase de disociación se monitorizó durante 180 segundos. Como una solución de regeneración, se añadió cloruro de magnesio 3 M a un caudal de 10 µl/min durante 30 segundos. En el análisis de datos, se usó un programa informático de análisis (programa informático de evaluación Biacore T100, versión 2.0.1) con un modelo de unión individualizado y se calculó la constante de velocidad de asociación (kon), la constante de velocidad de disociación (koff) y la constante de disociación (KD; KD = koff/kon). Los resultados obtenidos de la medición usando Biacore para los 6 tipos de anticuerpos DR5 humanizados se muestran en la Figura 10.

8)-2 Actividad citocida *in vitro* del anticuerpo hB273 contra líneas celulares de cáncer humano

El fragmento F(ab')₂ de cabra AffiniPure anti IgG humana específico del fragmento Fc (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 109-006-098) preparado a 50 µg/ml con Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) se dispensó a 45 µl/pocillo en una microplaca de 96 pocillos (fabricada por Corning Incorporated), y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después de lavar cada pocillo dos veces con PBS, se añadió el sobrenadante del cultivo de 293F que había permitido producir el anticuerpo en el apartado 5)-4-1, el anticuerpo cB273 purificado (Ejemplo 2-3-2), o IgG humana disponible en el comercio (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 009-000-003) a 50 µl/pocillo de tal manera que la concentración final del anticuerpo fuera de 150 a 1,5 ng/ml, y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después de lavar cada pocillo dos veces con PBS, se añadieron células Jurkat preparadas a 4,0 x 10⁴ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % a 50 µl/pocillo y se cultivaron en las condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % durante 23 horas. La cantidad de ATP procedente de las células viables se determinó cuantitativamente usando un kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega Corporation, n.º G7571), y se evaluó el efecto citocida de cada uno de los anticuerpos hB273 tomando como 100 % el valor obtenido de un pocillo en el que se añadió el medio en lugar de la solución de anticuerpo. Como resultado, como se muestra en la Figura 11, se observó una tendencia de que el anticuerpo hB273_H1-1/L1 mostraba una mayor actividad citocida que el anticuerpo hB273_H1/L1, basándose en que anticuerpo del anticuerpo hB273_H1-1/L1 se había diseñado. Por otro lado, los anticuerpos hB273_H2-1/L1 a hB273_H2-5/L1 exhibieron sustancialmente el mismo efecto citocida que el anticuerpo hB273_H2/L1, basándose en qué anticuerpo de los anticuerpos hB273_H2-1/L1 a hB273_H2-5/L1 se había diseñado.

[Ejemplo 9] Retirada del sitio de desamidación de la CDR del anticuerpo cB273

9)-1 Diseño de mutantes y construcción del vector de expresión

9)-1-1 Diseño de mutante

En general, la desamidación de la asparagina en una proteína se realiza a través de la formación de un estado de transición de succinimida cíclica entre la asparagina y un aminoácido adyacente en el lado C terminal (Geiger, T. y Clarke, S. (1987) Deamidation, Isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. J. Biol. Chem. 262, 785-794). Un factor límite de tasa para la formación de un estado de transición de succinimida cíclica es el tamaño de la cadena lateral del aminoácido adyacente, y por lo tanto, la glicina que tiene la cadena lateral más pequeña puede conseguir la tasa de desamidación más rápida. Por otro lado, sustituyendo el grupo adyacente en el lado C terminal por un aminoácido que tenga una cadena lateral larga, la tasa de desamidación puede suprimirse. El anticuerpo B273 tiene una secuencia -N-G-(asparagina-glicina) que es susceptible a desamidación tanto en la cadena L como en la cadena H. Por lo tanto, los autores de la presente invención produjeron mutantes puntuales en los que el grupo adyacente se cambió de glicina a lisina, fenilalanina, leucina o ácido glutámico, cada uno de los cuales tiene una cadena lateral más larga que la glicina. Es decir, el diseño de los mutantes se realizó de tal manera que en la cadena H, la secuencia -N-G-(asparagina-glicina) se mutó a la secuencia -N-E-(asparagina-ácido glutámico), y en la cadena L, la secuencia -N-G-(asparagina-glicina) se mutó a una secuencia N-L-(asparagina-leucina), a una secuencia -N-F-(asparagina-fenilalanina), a una secuencia -NK-(asparagina-lisina) o a una secuencia -NE-(asparagina-ácido glutámico).

9)-1-2-Construcción del vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NE

Usando como molde pEF6KCL/hB273_L1, que es el vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1 producido en el Ejemplo 5, un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores A y un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores B se ligaron entre sí mediante PCR de extensión solapante usando un conjunto de cebadores C. Un fragmento de ADN, obtenido escindiendo el fragmento de ADN así obtenido con las enzimas de restricción NheI y PmeI, se insertó en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo humanizado universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción

NheI y PmeI, por lo cual se construyó un vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NE en el que la glicina en el aminoácido número 54 de SEQ ID NO: 28 se sustituyó por ácido glutámico. El vector de expresión así obtenido se denominó "pEF6KCL/hB273_L1-NE".

5 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hB273_L1-NE se representa por SEQ ID NO: 51 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NE se representa por SEQ ID NO: 52 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de la SEQ ID NO: 51 y 52 también se muestran también en la Figura 44.

Conjunto de cebadores A

10 5'-aggtaagcttgctagcgcaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)
5'-ccaatgcaggaagtgttctcattgctatggaccagtgactg-3' (L-NE-R2: SEQ ID NO: 54 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores B

5'-cagtcactggtccatagcaatgagaacacttacctgcattgg-3' (L-NE-F2: SEQ ID NO: 55 en el Listado de Secuencias)
5'-ggatgccaccctgtaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores C

15 5'-aggtaagcttgctagcgcaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)
5'-ggatgccaccctgtaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

9)-1-3-Construcción del vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NF

20 Usando como molde pEF6KCL/hB273_L1, que es el vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1 producido en el Ejemplo, un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores A y un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores B se ligaron entre sí mediante PCR de extensión solapante usando un conjunto de cebadores C. Un fragmento de ADN obtenido por escisión del fragmento de ADN obtenido de esta manera con las enzimas de restricción NheI y PmeI se insertó en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo humanizado universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NheI y PmeI, mediante lo cual se construyó un vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NF, en el que la glicina en el número de aminoácido 54 de SEQ ID NO: 28 se sustituyó por fenilalanina. El vector de expresión así obtenido se denominó "pEF6KCL/hB273_L1-NF".

25 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hB273_L1-NF se representa por SEQ ID NO: 57 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NF se representa por SEQ ID NO: 58 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de SEQ ID NO: 57 y 58 también se muestran en la Figura 45.

Conjunto de cebadores A

30 5'-aggtaagcttgctagcgcaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)
5'-ccaatgcaggaagtgttgaaattgctatggaccagtgactg-3' (L-NF-R2: SEQ ID NO: 59 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores B

35 5'-cagtcactggtccatagcaattcaacacttacctgcattgg-3' (L-NF-F2: SEQ ID NO: 60 en el Listado de Secuencias)
5'-ggatgccaccctgtaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores C

40 5'-aggtaagcttgctagcgcaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)
5'-ggatgccaccctgtaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

9)-1-4 Construcción del vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NK

45 Usando como molde pEF6KCL/hB273_L1, que es el vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1 producido en el Ejemplo 5, un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores A y un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores B se ligaron entre sí por PCR de extensión solapante usando un conjunto de cebadores C. Un fragmento de ADN obtenido escindiendo el fragmento de ADN así obtenido con las enzimas de restricción NheI y PmeI se insertó en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo humanizado universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NheI y PmeI, mediante lo cual se construyó un vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NK, en el que la glicina en el número 54 de aminoácido de SEQ ID NO: 28 se sustituyó por lisina. El vector de expresión así obtenido se denominó "pEF6KCL/hB273_L1-NK".

50

Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hB273_L1-NK se representa por SEQ ID NO: 61 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NK se representa por SEQ ID NO: 62 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de SEQ ID NO: 61 y 62 también se muestran en la Figura 46.

5 Conjunto de cebadores A

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)
5'-ccaatgcaggaagtgttctattgctatggaccagtgactg-3' (L-NK-R2: SEQ ID NO: 63 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores B

10 5'-cagtcactggtccatagcaataagaacacttacctgattgg-3' (L-NK-F2: SEQ ID NO: 64 en el Listado de Secuencias)
5'-ggatgccaccctgtaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores C

5'-aggtaagcttgctagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)
5'-ggatgccaccctgtaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

9)-1-5 Construcción del vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NL

15 Usando como molde pEF6KCL/hB273_L1, que es el vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1 producido en el Ejemplo 5, un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores A y un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores B se ligaron entre sí mediante PCR de extensión solapante usando un conjunto de cebadores C. Un fragmento de ADN obtenido escindiendo el fragmento de ADN así obtenido con las enzimas de restricción NheI y PmeI se insertó en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo humanizado universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NheI y PmeI, mediante lo cual se construyó un vector de expresión de cadena ligera de tipo hB273_L1-NL, en el que la glicina en el aminoácido número 54 de SEQ ID NO: 28 se substituyó por leucina. El vector de expresión así obtenido se denominó "pEF6KCL/hB273_L1-NL".

25 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hB273_L1-NL se representa por SEQ ID NO: 65 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hB273_L1-NL se representa por SEQ ID NO: 66 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de SEQ ID NO: 65 y 66 también se muestran en la Figura 47.

Conjunto de cebadores A

30 5'-aggtaagcttgctagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)
5'-ccaatgcaggaagtgttctagattgctatggaccagtgactg-3' (L-NL-R2: SEQ ID NO: 67 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores B

5'-cagtcactggtccatagcaatctgaacacttacctgattgg-3' (L-NL-F2: SEQ ID NO: 68 en el Listado de Secuencias)
5'-ggatgccaccctgtaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores C

35 5'-aggtaagcttgctagcgccaccatggtgctgc-3' (L-F1: SEQ ID NO: 53 en el Listado de Secuencias)
5'-ggatgccaccctgtaaacggggcccctaacac-3' (L-R1: SEQ ID NO: 56 en el Listado de Secuencias)

9)-1-6 Construcción del vector de expresión de cadena pesada de tipo hB273_H2-1-NE

40 Usando como molde pEF1FCCU/hB273_H2-1, que es el vector de expresión de cadena pesada de tipo hB273_H2-1, producido en el Ejemplo 5, un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores A y un fragmento de ADN obtenido realizando PCR usando un conjunto de cebadores B se ligaron entre sí mediante PCR de extensión solapante usando un conjunto de cebadores C. Un fragmento de ADN obtenido escindiendo el fragmento de ADN así obtenido con las enzimas de restricción NheI y PmeI se insertó en el vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo humanizado universal (pEF1FCCU) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NheI y PmeI, mediante lo cual se construyó el vector de expresión de cadena pesada de tipo a hB273_H2-1-NE, en el que la glicina en el aminoácido número 74 de SEQ ID NO: 42 se substituyó por ácido glutámico. El vector de expresión así obtenido se denominó "pEF1FCCU/hB273_H2-1-NE".

50 Una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hB273_H2-1-NE se representa por SEQ ID NO: 69 en el Listado de Secuencias. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hB273_H2-1-NE se representa por SEQ ID NO: 70 en el Listado de Secuencias. Las secuencias de las SEQ ID NO: 69 y 70 también se muestran en la Figura 48.

Conjunto de cebadores A

5'-aggtaagcttgtagcgccacccatgaacacc-3' (H-F1: SEQ ID NO: 71 en el Listado de Secuencias)
 5'-ctggttgtagaagggtcctcgttgtaggggtgaaccggcc-3' (H-NE-R2: SEQ ID NO: 72 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores B

5 5'-ggccggttcaaccctacaacgaggacaccttctacaaccag-3' (H-NE-F2: SEQ ID NO: 73 en el Listado de Secuencias)
 5'-ggatgccaccggttaaacgggccgatatctc-3' (H-R1: SEQ ID NO: 74 en el Listado de Secuencias)

Conjunto de cebadores C

5'-aggtaagcttgtagcgccacccatgaacacc-3' (H-F1: SEQ ID NO: 71 en el Listado de Secuencias)
 5'-ggatgccaccggttaaacgggccgatatctc-3' (H-R1: SEQ ID NO: 74 en el Listado de Secuencias)

10 9)-2 Preparación del anticuerpo hB273 con CDR modificada

9)-2-1 Producción del anticuerpo hB273 con CDR modificada

Se sembraron $1,2 \times 10^9$ células de células FreeStyle 293F (Invitrogen Corporation) en la fase de crecimiento logarítmico, en 1,2 l de Medio de Expresión FreeStyle 293 reciente (Invitrogen Corporation) y se cultivaron durante 1 hora con agitación a 90 rpm a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. Se disolvieron 3,6 mg de polietilimina (Polyscience n.º 24765) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Posteriormente, un vector de expresión de cadena pesada (0,4 mg) y un vector de expresión de cadena ligera (0,8 mg) preparado con el Kit para plásmidos PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) se suspendieron en 20 ml de medio Opti-Pro SFM. Después, 20 ml del líquido obtenido de la mezcla de vectores de expresión/Opti-Pro SFM se añadieron a 20 ml del líquido obtenido de la mezcla de polietilimina/Opti-Pro SFM y la mezcla resultante se agitó suavemente y después se dejó reposar durante 5 minutos. Después de esto, la mezcla se añadió a las células FreeStyle 293F. Después de 3 horas se añadió Z-VAD-FMK (Peptide Institute, Inc.) a una concentración final de 10 µM y el cultivo se realizó agitando a 90 rpm durante 7 días a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. El sobrenadante del cultivo resultante se filtró a través de un filtro de cápsula desechable (Advantec n.º CCS-045-E1H).

Un anticuerpo de cB273 humanizado, obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-1-NE y pEF6KCL/hB273_L1-NE se denominó "hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NE", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-1-NE y pEF6KCL/hB273_L1-NF se denominó "hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NF", un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-1-NE y pEF6KCL/hB273_L1 se denominó "hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK", y un anticuerpo de cB273 humanizado obtenido por una combinación de pEF1FCCU/hB273_H2-1-NE y pEF6KCL/hB273_L1-NL se denominó "hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NL".

9)-2-2 Purificación del anticuerpo hB273 con CDR modificada

El sobrenadante del cultivo obtenido en el apartado 9)-2-1 anterior se purificó mediante un proceso en dos etapas que incluía cromatografía de afinidad de rProteína A (de 4 a 6 °C) e hidroxapatita de cerámica (a temperatura ambiente). Se realizó una etapa de reemplazo de tampón después de la purificación mediante cromatografía de afinidad de rProteína A y después de la purificación mediante hidroxapatita de cerámica a temperatura ambiente. Primero, se aplicaron de 1100 a 1200 ml de sobrenadante del cultivo a MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas HiTrap (volumen: 1 ml) conectadas en serie) equilibrado con PBS. Después de verter toda la solución de cultivo en la columna, esta se lavó con PBS usando de 15 a 30 ml. Posteriormente, se realizó la elución con una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4,0), y la fracción que contenía el anticuerpo se recogió. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), mediante lo cual el tampón se reemplazó con un tampón que contenía fosfato sódico 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Adicionalmente, la solución de anticuerpo sometida a reemplazo de tampón se aplicó a una columna de hidroxapatita de cerámica (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., columna de hidroxapatita Bio-Scale CHT2-1 (volumen: 2 ml)) equilibrada con un tampón que contenía NaPi 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Después, se realizó una elución de gradiente a concentración lineal con cloruro de sodio y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), por lo cual el líquido se reemplazó con CBS (tampón citrato 10 mM que contenía cloruro de sodio 140 mM, pH 6,0). Finalmente la solución resultante se concentró usando un Dispositivo de Filtro Centrifugal UF VIVASPIN 20 (peso molecular fraccional: 30 K, Sartorius Co., Ltd., a 44 °C), y la concentración de IgG se ajustó a 1,0 mg/ml o más, y la solución así obtenida se usó como una muestra purificada.

[Ejemplo 10] Medición de la actividad del anticuerpo B273 con CDR modificada

10)-1 Evaluación de la actividad de unión del anticuerpo hB273 modificado en la CDR usando Biacore

La constante de disociación de cada uno de los anticuerpos anti DR5 humanizados y rsDR5 se midió usando Biacore T100 (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) mediante un procedimiento de captura en el que un anticuerpo se captura mediante un anticuerpo anti IgG (Fc) humano inmovilizado y la medición se realizó usando un antígeno como analito. El anticuerpo anti IgG (Fc) humano (Kit de Captura de Anticuerpo Humano GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) se inmovilizó de manera covalente sobre una microplaca detectora CM5 (BIAcore, Inc.) a aproximadamente 10.000 UR mediante un procedimiento de acoplamiento con amina. La inmovilización se realizó también sobre una célula de referencia de la misma manera. Como tampón de desarrollo, se usó HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y tensoactivo P20 al 0,05 %). Sobre la microplaca que tenía el anticuerpo anti IgG (Fc) humano inmovilizado en su interior, se añadió una solución de anticuerpo a aproximadamente 20 nM a un caudal de 10 μ l/min durante 60 segundos y después, se añadió una serie en dilución de rsDR5 (3,13-50 nM) a un caudal de 30 μ l/min durante 120 segundos y posteriormente la fase de disociación se monitorizó durante 180 segundos. Como una solución de regeneración, se añadió cloruro de magnesio 3 M a un caudal de 10 μ l/min durante 30 segundos. En el análisis de los datos, se utilizó un programa informático de análisis (programa informático de evaluación Biacore T100, versión 2.0.1) con un modelo de unión individualizado y se calculó una constante de velocidad de asociación (kon), una constante de velocidad de disociación (koff) y una constante de disociación (KD; KD = koff/kon). En la Fig. 12 se muestran los resultados obtenidos de la medición usando Biacore para los 4 tipos de anticuerpos DR5 humanizados.

10)-2 Medición de la estabilidad térmica del anticuerpo anti DR5 humanizado y su mutante usando calorimetría de barrido diferencial (DSC)

La medición de la estabilidad térmica se realizó usando calorimetría de barrido diferencial (DSC). Se disolvió una muestra en un tampón CBS (que contenía ácido cítrico 10 mM y NaCl 140 mM y preparado a un pH de 6,0) a 0,5 mg/ml y se usaron partes alícuotas de 400 μ l de la misma como soluciones de muestra para la medición DSC. Las condiciones de medición de DSC se establecieron de la siguiente manera: temperatura inicial: 20 °C; temperatura final: 100 °C; velocidad de aumento de temperatura: 200 °C/hora; período de filtración: 2 segundos; y modo de retroalimentación: bajo. Como solución de referencia se usó CBS. Como dispositivo de medición DSC se utilizó la plataforma VP-Capillary DSC fabricada por MicroCal, Inc. (US) (actualmente GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd.) para todas las mediciones. La corrección de la línea basal se realizó restando la línea basal (una curva de barrido obtenida también llenando una célula de muestra con la solución de referencia) de una curva de barrido obtenida de la solución de muestra. El valor de la temperatura máxima pico en el termograma completo se definió como la Tm del punto medio de desnaturalización térmica de la región Fab. En la Fig. 13 se muestran los resultados de la medición DSC de los 4 tipos de anticuerpos DR5 humanizados.

10)-3 Actividad citocida *in vitro* del anticuerpo hB273 con CDR modificada contra líneas celulares de cáncer humano

El fragmento F(ab')₂ de cabra AffiniPure anti IgG humana específico del fragmento Fc (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 109-006-098) preparado a 50 μ g/ml con Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) se dispensó a 45 μ l/pocillo en una microplaca de 96 pocillos (fabricada por Corning Incorporated), y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después de lavar cada pocillo dos veces con PBS, el sobrenadante del cultivo de 293F, que había permitido producir el anticuerpo en el apartado 9)-2-1, se añadió a 50 μ l/pocillo de tal manera que la concentración final del anticuerpo fuera de 150 a 1,5 ng/ml, y la placa se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Después de lavar cada pocillo dos veces con PBS, se añadieron células Jurkat preparadas a 4,0 x 10⁴ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % a 50 μ l/pocillo y se cultivaron en las condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % durante 23 horas. La cantidad de ATP procedente de las células viables se determinó cuantitativamente usando un kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (fabricado por Promega Corporation, n.º G7571), y se evaluó el efecto citocida de cada uno de los anticuerpos hB273 tomando como 100 % el valor obtenido de un pocillo en el que se añadió el medio en lugar de la solución de anticuerpo. En la Fig. 14 se muestra la actividad citocida de cada uno de los 4 tipos de anticuerpos con CDR modificada.

10)-4 Efecto de la activación de caspasa-3/7 y actividad citocida *in vitro* del anticuerpo hB273_H2-1-NE/L1-NK en líneas celulares de cáncer humano

Cada una de una línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 y una línea celular de glioblastoma humano U-87MG se preparó a 1,1 x 10⁵ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10% o medio MEM (Medio Esencial Mínimo) que contenía FBS al 10 % y se añadió a una microplaca blanca de 96 pocillos de fondo transparente (fabricada por Corning Incorporated) a 45 μ l/pocillo y se cultivó durante una noche en las condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %. El anticuerpo hB273_H2-1-NE/L1-NK, el anticuerpo cB273, o la IgG humana (fabricada por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) se mezclaron con la misma concentración del fragmento específico AffiniPure de cabra anti-Fc γ de IgG humana (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., n.º 109-005-098), y la mezcla resultante se añadió a 5 μ l/pocillo de tal manera que la concentración final del anticuerpo hB273_H2-1-NE/L1-NK, del anticuerpo cB273 o de la IgG humana fuera de 10.000 a 0,1 ng/ml, y las células se cultivaron en condiciones de 37 °C y con CO₂ al 5 % durante 4 horas. La actividad de la caspasa-3/7 en cada pocillo se midió con un luminómetro (fabricado por Perkin Elmer, Inc.) usando un kit de ensayo Caspasa-Glo 3/7 (fabricado por Promega Corporation, n.º G8093). La medición se realizó después de incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Después, la actividad de la caspasa-3/7 se evaluó tomando como 100% el valor obtenido de un pocillo al cual se añadió medio en lugar de la solución de anticuerpo.

Además, la actividad citocida *in vitro* se evaluó midiendo la cantidad de ATP después de 24 horas de tratamiento con el anticuerpo de acuerdo con el procedimiento mostrado en el Ejemplo 3-3. Como resultado, se descubrió que el anticuerpo hB273_H2-1-NE/L1-NK tenía un efecto de activación de caspasa-3/7 y un efecto citocida comparable al del anticuerpo cB273 (Figura 15).

5 [Ejemplo 11] Efecto antitumoral *in vivo* del anticuerpo cB273.

11)-1 Actividad antitumoral del anticuerpo cB273

11)-1-1 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de cáncer de colon humano COLO 205

10 Por vía subcutánea, se implantaron 2×10^6 células de una línea celular de cáncer de colon humano, COLO 205 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos (CAN.N.Cg-Foxnl^{nu}/CrjCrlj, adquiridos en Charles River Laboratories Japón, Inc.). Los días 7, 14 y 21 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola, a una dosis de 1, 3 o 10 mg/kg (n = 10). El eje mayor y el eje menor del tumor implantado se midieron dos veces a la semana usando un calibrador digital electrónico (fabricado por Mitutoyo Corporation), y el volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula de cálculo:

$$15 \quad \text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = 1/2 \times (\text{eje menor})^2 \text{ (mm)} \times (\text{eje mayor})^2 \text{ (mm)}$$

Los resultados se muestran en la Figura 16. En todos los ratones del grupo al cual se administró el anticuerpo cB273 se observó degeneración completa del tumor.

11)-1-2 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de cáncer pancreático humano MIAPaCa-2

20 Por vía subcutánea se implantaron 3×10^6 células de una línea celular de cáncer pancreático humano, MIAPaCa-2 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 11, 19, 26 y 33 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola, a una dosis de 3 o 10 mg/kg (n = 10). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

25 Los resultados se muestran en la Figura 17. La tasa inhibidora del crecimiento tumoral el día 39 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 73,5 % en el grupo al que se administró la dosis de 3 mg/kg y de 77,4 % en el grupo al que se administró la dosis de 10 mg/kg.

11)-1-3 Actividad antitumoral en ratones desnudos a los que se implantó la línea celular de glioblastoma humano U-87MG

30 Por vía subcutánea, se implantaron 5×10^6 células de una línea celular de glioblastoma humano, U-87MG (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 4, 11, 18 y 25 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola, a una dosis de 1, 3 o 10 mg/kg (n = 10). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

35 Los resultados se muestran en la Figura 18. La tasa inhibidora del crecimiento tumoral el día 32 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 99,7 % en el grupo al que se administró la dosis de 1 mg/kg, de 97,8 % en el grupo al que se administró la dosis de 3 mg/kg y de 98,0 % en el grupo al que se administró la dosis de 10 mg/kg. Además, la degeneración completa del tumor se observó en 2 ratones de 10 en el grupo al que se administró la dosis de 1 mg/kg, en 5 ratones de 10 en el grupo al que se administró la dosis de 3 mg/kg y de 3 ratones de 10 en el grupo al que se administró la dosis de 10 mg/kg.

11)-1-4 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de cáncer de pulmón humano NCI-H2122 (en combinación con paclitaxel y carboplatino)

45 Por vía subcutánea, se implantaron 5×10^6 células de una línea celular de cáncer de pulmón humano, NCI-H2122 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 13 y 20 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola a una dosis de 10 mg/kg. El paclitaxel se administró por vía subcutánea a una dosis de 6,25 mg/kg los días 13, 14, 15, 16 y 17 después de la implantación. El carboplatino se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 100 mg/kg el día 13 después de la implantación (n = 10). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

50 Los resultados se muestran en la Figura 19. La tasa inhibidora del crecimiento tumoral el día 41 después de la implantación, que era el último día del tratamiento, fue de 99,6 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273, de 10,2 % en el grupo al que se administró la combinación de paclitaxel y carboplatino y de 99,7 % en el grupo al que se administró la combinación de anticuerpo cB273, paclitaxel y carboplatino.

11)-1-5 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de cáncer de pulmón humano NCI-H460 (en combinación con paclitaxel y carboplatino)

Por vía subcutánea, se implantaron 5×10^6 células de una línea celular de cáncer de pulmón humano, NCI-H460 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. El día 6 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró por vía intraperitoneal a ratones portadores de tumores a una dosis de 10 mg/kg. El paclitaxel se administró por vía subcutánea a una dosis de 6,25 mg/kg los días 6, 7, 8, 9 y 10 después de la implantación. El carboplatino se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 100 mg/kg el día 6 después de la implantación (n = 10). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

Los resultados se muestran en la Figura 20. La tasa inhibidora de crecimiento tumoral el día 16 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 43,3 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273, de 66,4 % en el grupo al que se administró la combinación de paclitaxel y carboplatino y de 79,6 % en el grupo al que se administró la combinación de anticuerpo cB273, paclitaxel y carboplatino

11)-1-6 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de cáncer de colon humano DLD-1 (en combinación con CPT-11)

Por vía subcutánea, se implantaron 5×10^6 células de una línea celular de cáncer de colon humano, DLD-1 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. El día 35 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró por vía intraperitoneal a ratones portadores de tumores a una dosis de 10 mg/kg. CPT-11 se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 80 mg/kg los días 35, 40 y 43 después de la implantación (n = 10). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

Los resultados se muestran en la Figura 21. La tasa inhibidora del crecimiento tumoral el día 55 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 25,9 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273, de 29,5 % en el grupo al que se administró CPT-11 y de 72,7 % en el grupo al que se administró la combinación de anticuerpo cB273 y CPT-11.

11)-1-7 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 (en combinación con CPT-11)

Por vía subcutánea, se implantaron 5×10^6 células de una línea celular de cáncer de colon humano, HCT-15 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. El día 7 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola, a una dosis de 10 mg/kg. CPT-11 se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 80 mg/kg los días 7, 10 y 14 después de la implantación (n = 10). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

Los resultados se muestran en la Figura 22. La tasa inhibidora del crecimiento tumoral el día 31 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 52,8 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273, de 83,5 % en el grupo al que se administró CPT-11 y de 97,8 % en el grupo al que se administró la combinación de anticuerpo cB273 y CPT-11.

11)-1-8 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de cáncer de colon humano HCT-116 (en combinación con CPT-11)

Por vía subcutánea, se implantaron 1×10^7 células de una línea celular de cáncer de colon humano, HCT-116 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. El día 7 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola a una dosis de 10 mg/kg. CPT-11 se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 65 mg/kg los días 7, 10 y 14 después de la implantación (n = 10). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

Los resultados se muestran en la Figura 23. La tasa inhibidora del crecimiento tumoral el día 28 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 13,9 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273, de 89,8 % en el grupo al que se administró CPT-11 y de 99,7 % en el grupo al que se administró la combinación de anticuerpo cB273 y CPT-11.

11)-1-9 Actividad antitumoral en ratones desnudos en los que se implantó la línea celular de melanoma humano A375 (en combinación con vinblastina)

Por vía subcutánea, se implantaron 2×10^6 células de una línea celular de melanoma humano, A375 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 10, 17 y 24 después de la implantación, el anticuerpo cB273 se administró a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola a una dosis de 10 mg/kg. La vinblastina se administró a través de la vena de la cola a una dosis de 10 mg/kg 10 días después de la implantación

(n = 10). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

Los resultados se muestran en la Figura 24. La tasa inhibidora del crecimiento tumoral el día 46 después del implante, que era el último día de la medición, fue de 53,1% en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273, de 43,6% en el grupo al que se administró vinblastina y del 100% en el grupo al que se administró la combinación de anticuerpo cB273 y vinblastina, y en todos los ratones en el grupo de administración combinada del anticuerpo cB273 y vinblastina se observó degeneración completa del tumor.

11)-2 Comparación de la actividad antitumoral entre el anticuerpo cB273 y conatumumab

11)-2-1 Preparación de conatumumab

10 Conatumumab se preparó basándose en las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas descritas en el WHO Drug Information, Vol. 22, n.º 2, 2008, págs. 129-130.

11)-2-1-1 Construcción del vector de expresión de cadena ligera de conatumumab

15 Se sintetizó un ADN que contenía un gen que codificaba una región variable de cadena ligera de conatumumab representada por los números de aminoácidos 21 a 130 de SEQ ID NO: 76 (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service). Después, un fragmento de ADN obtenido por escisión del ADN sintetizado con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI, se insertó en el vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo humanizado universal (pEF6KCL) en el sitio escindido con las enzimas de restricción NdeI y BsiWI, mediante lo cual se construyó un vector de expresión de cadena ligera de conatumumab. El vector de expresión obtenido de este modo se denominó "pEF6KCL/Conatumumab_L".

20 11)-2-1-2 Construcción del vector de expresión de cadena pesada de conatumumab

25 Se sintetizó un ADN que contenía un gen que codificaba una región variable de cadena pesada de conatumumab representada por los números de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 78 en el Listado de Secuencias (GENEART, Inc. Artificial Gene Synthesis Service). Después un fragmento de ADN obtenido por escisión del ADN sintetizado con la enzima de restricción BlnI se insertó en el vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo humanizado universal (pEF1FCCU) en el sitio escindido con la enzima de restricción BlnI, mediante lo cual se construyó el vector de expresión de cadena pesada de conatumumab. El vector de expresión obtenido de este modo se denominó "pEF1FCCU/Conatumumab H".

11)-2-1-3 Producción de conatumumab

30 Se sembraron $1,2 \times 10^9$ células de células FreeStyle 293F (Invitrogen Corporation) en la fase de crecimiento logarítmico en 1,2 l de Medio de Expresión FreeStyle 293 reciente (Invitrogen Corporation) y se cultivaron durante 1 hora con agitación a 90 rpm a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. Se disolvieron 3,6 mg de polietilimina (Polyscience n.º 24765) en 20 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corporation). Posteriormente, el vector de expresión de cadena pesada pEF1FCCU/Conatumumab_H (0,4 mg) y el vector de expresión de cadena ligera pEF6KCL/Conatumumab_L (0,8 mg) preparados con el Kit para Plásmidos PureLink HiPure (Invitrogen Corporation) se suspendieron en 20 ml de medio Opti-Pro SFM. Después, 20 ml del líquido obtenido de la mezcla de vectores de expresión/Opti-Pro SFM se añadieron a 20 ml del líquido obtenido de la mezcla de polietilimina/Opti-Pro SFM y la mezcla resultante se agitó suavemente y después se dejó reposar durante 5 minutos. Después de esto, la mezcla se añadió a células FreeStyle 293F y se realizó el cultivo agitando a 90 rpm durante 7 días a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 8 %. El sobrenadante del cultivo resultante se filtró a través de un filtro de cápsula desechable (Advantec n.º CCS-045-E1H).

11)-2-1-4 Purificación de conatumumab

45 El sobrenadante del cultivo obtenido en el apartado 11)-2-1-3 anterior se purificó mediante un proceso en dos etapas que incluía cromatografía de afinidad de rProteína A (de 4 a 6 °C) e hidroxapatita de cerámica (a temperatura ambiente). Se realizó una etapa de reemplazo de tampón después de la purificación mediante cromatografía de afinidad de rProteína A y después de la purificación mediante hidroxapatita de cerámica a temperatura ambiente. En primer lugar, se aplicaron de 1100 a 1200 ml de sobrenadante del cultivo a MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas HiTrap (volumen: 1 ml) conectadas en serie) equilibrado con PBS. Después de verter toda la solución del cultivo en la columna, esta columna se lavó con PBS de 15 a 30 ml. Posteriormente, se realizó elución con una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4,0) y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), mediante lo cual el tampón se reemplazó POR un tampón que contenía fosfato de sodio 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Después, la solución de anticuerpo sometida a reemplazo de tampón se aplicó a una columna de hidroxapatita de cerámica (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., columna de hidroxapatita Bio-Scale CHT2-1 (volumen: 2 ml)) equilibrada con un tampón que contenía NaPi 5 mM, MES 50 mM y NaCl 20 mM a pH 6,5. Después, se realizó elución en gradiente a concentración lineal con cloruro de sodio y se recogió una fracción que contenía el

anticuerpo. La fracción se aplicó a una columna desalinizadora (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Co., Ltd., dos columnas desalinizadoras HiTrap (volumen: 5 ml) conectadas en serie), mediante lo cual el líquido se reemplazó por CBS (tampón citrato 10 mM que contenía cloruro de sodio 140 mM, pH 6,0). Finalmente la solución resultante se concentró usando el Dispositivo Centrifugal UF Filter VIVASPIN 20 (peso molecular fraccional: 30 K, Sartorius Co., Ltd., a 4 °C) y la concentración de IgG se ajustó a 1,0 mg/ml o más, y la solución así obtenida se usó como una muestra purificada.

11)-2-2 Comparación de la actividad antitumoral en ratones desnudos a los que se implantó la línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 entre el anticuerpo cB273 y conatumumab

Por vía subcutánea, se implantaron 1×10^7 células de una línea celular de cáncer de colon humano, HCT-15 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 6, 13 y 20 después de la implantación, se administró el anticuerpo cB273 o conatumumab a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola a una dosis de 3, 10 o 30 mg/kg ($n = 10$). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

Los resultados se muestran en la Fig. 25. La tasa inhibidora del crecimiento tumoral el día 30 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 57,9 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273 a la dosis de 3 mg/kg, de 56,0 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273 a la dosis de 10 mg/kg, de 53,6 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273 a la dosis de 30 mg/kg, de 27,4 % en el grupo al que se administró conatumumab a la dosis de 3 mg/kg, de 26,9 % en el grupo al que se administró conatumumab a la dosis de 10 mg/kg y de 20,3 % en el grupo al que se administró conatumumab a la dosis de 30 mg/kg.

11)-2-3 Comparación de la actividad antitumoral en ratones desnudos a los que se implantó la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H1975 entre el anticuerpo cB273 y conatumumab

Por vía subcutánea, se implantaron 3×10^6 células de una línea celular de cáncer de pulmón humano, NCI-H1975 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 12, 19 y 26 después de la implantación, el anticuerpo cB273 o conatumumab se administraron a ratones portadores de tumores a través de la vena de la cola a una dosis de 3 o 10 mg/kg ($n = 10$). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

Los resultados se muestran en la Figura 26. La tasa inhibidora de crecimiento tumoral el día 32 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 71,5 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273 a la dosis de 3 mg/kg, de 73,3 % en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273 a la dosis de 10 mg/kg, de 13,5 % en el grupo al que se administró conatumumab a la dosis de 3 mg/kg y de 12,6 % en el grupo al que se administró conatumumab a la dosis de 10 mg/kg.

[Ejemplo 12] Efecto antitumoral *in vivo* del anticuerpo hB273_H2-1-NE/ hB273-L1-NK

12)-1 Actividad antitumoral del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK en ratones desnudos a los que se implantó la línea celular de cáncer de colon humano COLO 205

Por vía subcutánea, se implantaron 2×10^6 células de una línea celular de cáncer de colon humano, COLO 205 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 8, 15 y 22 después de la implantación, se administró el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK o el anticuerpo cB273 a ratones portadores de tumor a través de la vena de la cola a una dosis de 0,3 o 3 mg/kg ($n = 10$). De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral.

Los resultados se muestran en la Figura 27. Se observó degeneración completa del tumor en todos los ratones del grupo al que se administró el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK a la dosis de 3 mg/kg y en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273 a la dosis de 0,3 mg/kg. Adicionalmente, se observó degeneración completa del tumor en 9 ratones de 10 en el grupo al que se administró el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK a una dosis de 0,3 mg/kg, y en 8 ratones de 10 en el grupo al que se administró el anticuerpo cB273 a una dosis de 3 mg/kg.

[Ejemplo 13] Actividad citocida *in vitro* del anticuerpo hB273_H2-1-NE/ hB273-L1-NK contra líneas celulares de cáncer humano

NCI-N87, KATO-III y SNU-16 (cada una de las cuales es una línea de células de cáncer de estómago humano), Caki-1, ACHN y 786-0 (cada una de las cuales es una línea celular de cáncer renal humano), Hep3B, SK-HEP-1 y HepG2 (C3A) (cada de las cuales es una línea celular de cáncer de hígado humano) y HT-1080 (que es una línea celular de fibrosarcoma humano) se adquirieron en la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC). GCIY (que es una línea celular de cáncer de estómago humano) se adquirió en RIKEN. HuH-7 (que es una línea celular de cáncer de hígado humano) se adquirió en el Instituto Nacional de Innovación Biomédica.

Las actividades citocidas *in vitro* contra diversos tipos de líneas celulares se midieron mediante el siguiente procedimiento. En cuanto a la línea celular de cáncer de estómago, la línea celular de cáncer renal y la línea celular de fibrosarcoma, células apropiadamente subcultivadas se contaron mediante un procedimiento de tinción con azul

de tripano y después de esto se prepararon a 1×10^5 células/ml en un medio que contenía suero bovino fetal al 10 % (fabricado por Hyclone Laboratories, Inc.) (en lo sucesivo en el presente documento denominado como “el medio”). En el medio, se mezclaron el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK a 20 µg/ml y un anticuerpo secundario (anticuerpo anti IgG humano de cabra, fabricado por MP Biomedicals, LLC.) a 40 µg/ml. Después, la mezcla

5 resultante se diluyó con el medio, por lo cual se prepararon soluciones de tal manera que la concentración del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK era de 2000, 200, 20 o 2 ng/ml. Cada una de las soluciones resultantes, que tenían las concentraciones respectivas, se añadieron a una microplaca de 96 pocillos transparentes (fabricada por Corning Incorporated) a 50 µl/pocillo (3 pocillos por grupo) y la suspensión celular se sembró a 50 µl/pocillo (5×10^3 células) (concentración final del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK: 10000, 1000, 100, 10 o 1 ng/ml).

10 En cuanto a la línea celular de cáncer de hígado, células apropiadamente subcultivadas se contaron mediante un procedimiento de tinción con azul de tripano y después de esto se prepararon a 4×10^4 células/ml en el medio. En el medio, se mezclaron el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK a 2 µg/ml y el anticuerpo secundario a 4 µg/ml. Después, la mezcla resultante se diluyó con el medio, por lo cual las soluciones se prepararon de tal manera que la

15 soluciones resultantes que tenían las concentraciones respectivas se añadieron a una microplaca negra de 96 pocillos de fondo transparente (fabricada por Corning Incorporated) a 50 µl/pocillo (2 pocillos por grupo), y la suspensión celular se sembró a 50 µl/pocillo (2×10^3 células) (concentración final del anticuerpo: 1000, 100, 10, 1, 0,1 o 0,01 ng/ml).

20 Las células se cultivaron a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % durante 72 horas y se midió la cantidad de ATP en cada pocillo. La medición de la cantidad de ATP se realizó usando un reactivo luminiscente de luciferasa (CellTiter-Glo, fabricado por Promega Corporation) de acuerdo con el protocolo adjunto. Es decir, a la placa de 100 µl por pocillo, se añadió una solución de ensayo compuesta por un componente de lisado celular y un componente de sustrato luminiscente, seguido de agitación. Después de esto, se midió la luminiscencia de cada pocillo usando un

25 luminómetro (fabricado por Berthold Technologies). En cuanto a la línea celular de cáncer de estómago, la línea celular de cáncer renal y la línea celular de fibrosarcoma, una solución de ensayo en una cantidad de 100 µl por pocillo, se transfirió de la microplaca de 96 pocillos transparentes a una microplaca blanca de 96 pocillos (fabricada por Corning Incorporated), y después, se midió la luminiscencia.

Un pocillo, al cual se añadió el medio y la suspensión celular, se preparó como un pocillo de control negativo, un pocillo, al cual solo se añadió medio se preparó como un pocillo de fondo y la viabilidad celular en cada pocillo de

30 ensayo se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula.

Viabilidad celular (%) = $(\text{intensidad de luminiscencia del pocillo de ensayo} - \text{intensidad de luminiscencia promedio del pocillo de fondo}) / (\text{intensidad de luminiscencia promedio del pocillo de control negativo} - \text{intensidad de luminiscencia promedio del pocillo de fondo}) \times 100$

35 En la Figura 51, se muestra un promedio de la viabilidad celular de cada línea celular para las concentraciones respectivas del anticuerpo usado en el tratamiento. En cuanto a la línea celular de cáncer de estómago, la línea celular de cáncer renal y la línea celular de fibrosarcoma, un error típico se representó mediante una barra de error. El anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK exhibió una actividad citotóxica contra todas las líneas celulares ensayadas excepto para 786-O.

40 **[Ejemplo 14] Medición de la actividad *in vivo* del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK en combinación con un agente quimioterapéutico**

14)-1 Actividad antitumoral del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK en combinación con 5-FU en ratones desnudos a los que se implantó la línea celular de cáncer de colon humano HCT-15 y comparación de actividad con conatumumab

45 Por vía subcutánea, se implantaron 1×10^7 células de una línea celular de cáncer de colon humano, HCT-15 (adquirida en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos (CAN.Cg-Foxnl^{fl}/Crj, adquiridos en Charles River Laboratories Japón, Inc.). Los días 7, 14 y 21 después de la implantación, a través de la vena de la cola, se administró el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK o conatumumab a ratones portadores de tumores, a una dosis de 3 mg/kg. El 5-FU se administró a través de la vena de la cola el día 7 después de la implantación a una

50 dosis de 160 mg/kg. El experimento se realizó a $n = 6$. El eje mayor y el eje menor del tumor implantado se midieron dos veces a la semana usando un calibrador digital electrónico (fabricado por Mitutoyo Corporation), y el volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula de cálculo:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = 1/2 \times (\text{eje menor})^2 \text{ (mm)} \times (\text{eje mayor})^2 \text{ (mm)}$$

Los resultados se muestran en la Figura 52. La tasa inhibidora de crecimiento tumoral el día 28 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 62 % en el grupo al que se había administrado el

55 anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK, de 27 % en el grupo al que se había administrado conatumumab, de 54 % en el grupo al que se había administrado 5-FU, de 91 % en el grupo al que se había administrado la combinación de anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK y 5-FU y de 78 % en el grupo al que se había administrado la combinación de conatumumab y 5-FU. Es decir, se observó un efecto combinado del anticuerpo

hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK y 5-FU, y adicionalmente, en el grupo al que se había administrado la combinación del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK y 5-FU se observó una mayor actividad antitumoral en comparación con el grupo al que se había administrado la combinación de conatumumab y 5-FU.

5 14)-2 Actividad antitumoral del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK en combinación con paclitaxel en ratones desnudos a los que se implantó la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano NCI-H1975 y comparación de actividad con conatumumab

10 Por vía subcutánea, se implantaron 3×10^6 células de una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano, NCI-H1975 (adquirido en la ATCC), en la región axilar de ratones desnudos. Los días 11, 18 y 25 después de la implantación, a través de la vena de la cola, se administró el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273-L1-NK o conatumumab a ratones portadores de tumores, a una dosis de 3 mg/kg. El paclitaxel se administró, a través de la vena de la cola, a ratones portadores de tumores, los días 11, 12, 13 y 14 después de la implantación, a una dosis de 6,25 mg/kg. El experimento se realizó a $n = 6$. De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se midió el eje mayor y el eje menor del tumor implantado y se calculó el volumen tumoral

15 Los resultados se muestran en la Figura 53. La tasa inhibitoria del crecimiento tumoral el día 32 después de la implantación, que era el último día de la medición, fue de 66 % en el grupo al que se había administrado el anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK, de 40 % en el grupo al que se había administrado conatumumab, de 49 % en el grupo al que se había administrado paclitaxel, de 91 % en el grupo al que se había administrado la combinación del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK y paclitaxel y de 79 % en el grupo al que se había administrado la combinación de conatumumab y paclitaxel. Es decir, se observó un efecto combinado del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK y paclitaxel y adicionalmente, se observó una actividad antitumoral más alta en el grupo de administración combinada del anticuerpo hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK y paclitaxel en comparación con el grupo de administración combinada de conatumumab y paclitaxel.

Listado de secuencias

25 <110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> Un nuevo anticuerpo anti-DR5

30 <130> DSPCT-FP1141

<150> JP 2010-243549

<151 > 29-10-2010

35 <160> 89

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

40 <211 > 15

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

45 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15

<210> 2

<211> 20

50 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

 Asp Gln Ala Ser
 20

55

<210> 3
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador MH258E1F1
 <400> 3
 10 aagaattcat gggatggagc tgtatc 26
 <210>4
 <211> 32
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador G1EVR1
 20 <400> 4
 aagatatcct attaccagg agagtgggag ag 32
 <210> 5
 <211> 26
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador MK19EIF1
 30 <400>5
 aagaattcat gaagttgcct gttagg 26
 <210>6
 <211> 32
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador KEVR1
 40 <400> 6
 aagatatcct aacactcatt cctgtgaag ct 32
 <210> 7
 <211> 1395
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 50 <220>
 <221 > CDS
 <222> (1) .. (1395)
 <400> 7
 55

ES 2 573 115 T3

atg gga tgg agc tgt atc ttt ctc ttt ctc ctg tca gta act gta ggt	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Val Gly	
1 5 10 15	
gtg ttc tct gag gtt cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag	96
Val Phe Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys	
20 25 30	
cct ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttt	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
35 40 45	
att ggc tac ttt atg aac tgg atg aag cag agc cat gga aag agc ctt	192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	
50 55 60	
gag tgg att gga cgt ttt aat cca tac aat ggt gat act ttc tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tct acc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr	
85 90 95	
aca gcc cac atg gag ctc ctg agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc	336
Thr Ala His Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
100 105 110	
tat ttt tgt gga aga tcg gcg tat tac ttc gat agt ggg ggc tac ttt	384
Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe	

ES 2 573 115 T3

115					120					125						
gac	tac	tgg	ggc	caa	ggc	acc	act	ctc	aca	gtc	tcc	tca	gcc	aaa	acg	432
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	
	130					135					140					
aca	ccc	cca	tct	gtc	tat	cca	ctg	gcc	cct	gga	tct	gct	gcc	caa	act	480
Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	
	145				150					155					160	
aac	tcc	atg	gtg	acc	ctg	gga	tgc	ctg	gtc	aag	ggc	tat	ttc	cct	gag	528
Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	
				165					170					175		
cca	gtg	aca	gtg	acc	tgg	aac	tct	gga	tcc	ctg	tcc	agc	ggt	gtg	cac	576
Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	
			180					185					190			
acc	ttc	cca	gct	gtc	ctg	cag	tct	gac	ctc	tac	act	ctg	agc	agc	tca	624
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	
		195					200					205				
gtg	act	gtc	ccc	tcc	agc	acc	tgg	ccc	agc	gag	acc	gtc	acc	tgc	aac	672
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	
	210					215					220					
gtt	gcc	cac	ccg	gcc	agc	agc	acc	aag	gtg	gac	aag	aaa	att	gtg	ccc	720
Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	
	225				230					235					240	
agg	gat	tgt	ggt	tgt	aag	cct	tgc	ata	tgt	aca	gtc	cca	gaa	gta	tca	768
Arg	Asp	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	
			245					250						255		
tct	gtc	ttc	atc	ttc	ccc	cca	aag	ccc	aag	gat	gtg	ctc	acc	att	act	816
Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	
			260					265					270			
ctg	act	cct	aag	gtc	acg	tgt	gtt	gtg	gta	gac	atc	agc	aag	gat	gat	864
Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	
		275				280						285				
ccc	gag	gtc	cag	ttc	agc	tgg	ttt	gta	gat	gat	gtg	gag	gtg	cac	aca	912
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	
	290					295					300					
gct	cag	acg	caa	ccc	cgg	gag	gag	cag	ttc	aac	agc	act	ttc	cgc	tca	960
Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	
	305				310					315					320	
gtc	agt	gaa	ctt	ccc	atc	atg	cac	cag	gac	tgg	ctc	aat	ggc	aag	gag	1008
Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
				325					330					335		
ttc	aaa	tgc	agg	gtc	aac	agt	gca	gct	ttc	cct	gcc	ccc	atc	gag	aaa	1056
Phe	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	
			340					345					350			
acc	atc	tcc	aaa	acc	aaa	ggc	aga	ccg	aag	gct	cca	cag	gtg	tac	acc	1104
Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
		355				360						365				
att	cca	cct	ccc	aag	gag	cag	atg	gcc	aag	gat	aaa	gtc	agt	ctg	acc	1152
Ile	Pro	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	
	370					375					380					

ES 2 573 115 T3

tgc atg ata aca gac ttc ttc cct gaa gac att act gtg gag tgg cag 1200
 Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln
 385 390 395 400

tgg aat ggg cag cca gcg gag aac tac aag aac act cag ccc atc atg 1248
 Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met
 405 410 415

gac aca gat ggc tct tac ttc gtc tac agc aag ctc aat gtg cag aag 1296
 Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys
 420 425 430

agc aac tgg gag gca gga aat act ttc acc tgc tct gtg tta cat gag 1344
 Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
 435 440 445

ggc ctg cac aac cac cat act gag aag agc ctc tcc cac tct cct ggt 1392
 Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
 450 455 460

aaa 1395
 Lys
 465

<210> 8

<211> 465

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 8

Met Gly Trp Ser Cys Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Val Gly
 1 5 10 15

Val Phe Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr
 85 90 95

Thr Ala His Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125

10

ES 2 573 115 T3

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 130 135 140

Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr
 145 150 155 160

Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn
 210 215 220

Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro
 225 230 235 240

Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser
 245 250 255

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr
 260 265 270

Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp
 275 280 285

Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr
 290 295 300

Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser
 305 310 315 320

Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335

Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365

Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr
 370 375 380

Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln

ES 2 573 115 T3

```

385              390              395              400
.
Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met
      405              410              415

Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys
      420              425              430

Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
      435              440              445

Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
      450              455              460

Lys
465

```

```

5 <210> 9
  <211> 714
  <212> ADN
  <213> Mus musculus

10 <220>
    <221> CDS
    <222> (1)..(714)

    <400> 9

```

ES 2 573 115 T3

```

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct      48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1                               5                               10                               15

tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc      96
Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
                               20                               25                               30

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt     144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
                               35                               40                               45

gta cac agt aat gga aac acc tat cta cat tgg tac ctg cag aag cca     192
Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
                               50                               55                               60

ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct     240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65                               70                               75                               80

ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca     288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                               85                               90                               95

ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat ttc tgc     336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys
                               100                              105                              110

tct caa agt aca cat gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg     384
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
                               115                              120                              125

gaa atc aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca     432
Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
130                              135                              140

tcc agt gag cag tta aca tct gga ggt gcc tca gtc gtg tgc ttc ttg     480
Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Val Cys Phe Leu
145                              150                              155                              160

aac aac ttc tac ccc aaa gac atc aat gtc aag tgg aag att gat ggc     528
Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
                               165                               170                               175

agt gaa cga caa aat ggc gtc ctg aac agt tgg act gat cag gac agc     576
Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
                               180                               185                               190

aaa gac agc acc tac agc atg agc agc acc ctc acg ttg acc aag gac     624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
                               195                               200                               205

gag tat gaa cga cat aac agc tat acc tgt gag gcc act cac aag aca     672
Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
210                              215                              220

tca act tca ccc att gtc aag agc ttc aac agg aat gag tgt             714
Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225                              230                              235

```

<210> 10

<211> 238

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 10

5

ES 2 573 115 T3

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
 145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
 165 170 175

Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
 195 200 205

Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
 210 215 220

Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

5

<210> 11
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 573 115 T3

<223> Cebador EFF1

<400> 11
5 ccacgcgccc gtagcggcg cattaagc 28

<210> 12
<211> 30
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador EFsmaR

<400> 12
15 aaaccggga gcttttgca aaagcctagg 30

<210> 13
<211> 1704
20 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos del péptido señal, de la región Fc y de la señal de adición de poli A de la
25 cadena kappa humana.

<400> 13

ES 2 573 115 T3

```

ggtáccacccc aagctggcta ggtaagcttg ctagegccac catggtgctg cagaccocagg 60
tgttcatctc cctgctgctg tggatctccg gcgcatatgg cgatatcgtg atgattaaac 120
gtacgggtggc cgcéccctcc gtgttcatct tccccccctc cgacgagcag ctgaagtccg 180
gcaccgcctc cgtgggtgtgc ctgctgaata acttctaccc cagagaggcc aaggtgcagt 240
ggaaggtgga caacgcctcg cagtccggga actcccagga gagcgtgacc gagcaggaca 300
gcaaggacag cacctacagc ctgagcagca ccttgaccct gagcaaagcc gactacgaga 360
agcacaaggt gtacgcctgc gaggtgáccc accagggcct gagctcccc gtcaccaaga 420
gcttcaacag gggggagtgt taggggcccg tttaaacggg tggcatccct gtgaccctc 480
cccagtgcct ctccctggccc tggáagttgc cactccagtg cccaccagcc ttgtcctaát 540
aaaattaagt tgcátcattt tgtctgacta ggtgtccttc tataatatta tgggggtggag 600
gggggtggtá tggagcaagg ggcaagttgg gaagacaacc tgtagggcct ggggggtcta 660
ttgggaacca agctggagtg cagtggcaca atcttggctc actgcaatct cgcctcctg 720
ggttcaagcg attctcctgc ctacgcctcc cgagtgttg ggattccagg catgcatgac 780
caggctcacc taátttttgt ttttttgta gagacgggg ttcaccatát tggccaggct 840
ggtctccaac tctaatctc aggtgateta cccaccttg cctcccaaat tgcctgggatt 900
acaggcgtga accactgctc cacgcgcct gtacggcgc áttaagcgc ggggtgtgg 960
tggttacggc cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct agcgcctcct ctttctgctt 1020
tcttccctc ctttctcgc acgttcgcg gcttcccg tcaagctcta aatcggggc 1080
tccttttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctga ccccaaaaa cttgattagg 1140
gtgatggtc acgtagtgg ccatcgccct gatagcgg ttttgcctc ttgacgttg 1200
agtccacgtt cttaaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct 1260
cggctctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg 1320
agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt aattctgtgg aatgtgtgtc agttagggtg 1380
tggaagctcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcac tcaattagtc 1440
agcaaccagg tgtggaaagt cccaggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca 1500
tctcaattag tcagcaacca tagtccgcc cctaaactcc cccatccgc ccctaactcc 1560
gcccagttcc gccattctc cgcctcctg ctgactaatt tttttattt atgcagaggc 1620
cgaggccgcc tctgcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct 1680
aggcttttgc aaaaagctcc cggg 1704

```

5 <210> 14
 <211> 1120
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos del péptido. señal y de la región Fc de la cadena de IgG1 humana
 <400> 14

ES 2 573 115 T3

tgctagcgcc accatgaaac acctgtggtt cttcctcctg ctggtggcag ctcccagatg 60
 ggtgctgagc caggtgcaat tgtgcaggcg gttagctcag cctccaccaa gggcccaagc 120
 gtcttcccc tggcacccctc ctccaagagc acctctggcg gcacagccgc cctgggctgc 180
 ctggtcaagc actacttccc cgaacccctg accgtgagct ggaactcagg cgccctgacc 240
 agcggcgtgc acacettccc cgctgtcctg cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 300
 gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 360
 aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagcca aatcttgtga caaaactcac 420
 acatgcccac cctgcccagc acctgaactc ctggggggac cctcagtctt cctcttcccc 480
 ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 540
 gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 600
 cataatgcca agacaaagcc cggggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 660
 gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 720
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg ccagcccggg 780
 gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 840
 ctgacctgcc tgggtcaaag cttctatccc agcgacatcg cgtggagtg ggagagcaat 900
 ggccagcccg agaacaacta caagaccacc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 960
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcagggcaa cgtcttctca 1020
 tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac cactacacc agaagagcct ctccctgtct 1080
 cccggcaaat gagatatcg gcccgtttaa .acgggtggca 1120

5 <210> 15
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de quimera B273
 <220>
 <221 > CDS
 <222> (1) .. (717)

15 <400> 15

ES 2 573 115 T3

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc	48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
1 5 10 15	
ggc gca tat ggc gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct	96
Gly Ala Tyr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro	
20 25 30	
gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc	144
Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	
35 40 45	
ctt gta cac agt aat gga aac acc tat cta cat tgg tac ctg cag aag	192
Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys	
50 55 60	
cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt	240
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	
65 70 75 80	
tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc	288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
85 90 95	
aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat ttc	336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe	
100 105 110	
tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag	384
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys	
115 120 125	
ctg gaa atc aaa cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc	432
Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
130 135 140	
ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg	480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
145 150 155 160	
ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac	528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	
165 170 175	
aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac	576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
180 185 190	
agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa	624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys	
195 200 205	
gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag	672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln	
210 215 220	
ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt	717
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
225 230 235	

<210> 16
 <211 > 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 16

ES 2 573 115 T3

Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser				
1				5					10						15				
Gly	Ala	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro				
			20					25					30						
Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser				
		35					40					45							
Leu	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys				
	50					55					60								
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe				
65					70					75					80				
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe				
				85					90					95					
Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Ile	Tyr	Phe				
			100					105						110					
Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys				
		115					120					125							
Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro				
	130					135						140							
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu				
145					150					155					160				
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp				
				165					170					175					
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp				
			180					185					190						
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys				
		195					200						205						
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln				
	210					215					220								
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
225					230					235									

ES 2 573 115 T3

5 <210> 17
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador B273LF

10 <400> 17
aaacatatgg cgatgttg atgacccaaa ctccacttc c 41

15 <210> 18
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador B273LR

20 <400> 18
aaacgtacgt ttgattcca gcttggtgcc tccaccgaac g 41

25 <210> 19
<211> 1413
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de quimera B273

<220>
<221 > CDS
<222> (1)..(1413)

35 <400> 19

ES 2 573 115 T3

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
gtg ctg agc gag gtt cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag	96
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys	
20 25 30	
cct ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttt	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
35 40 45	
att ggc tac ttt atg aac tgg atg aag cag agc cat gga aag agc ctt	192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	
50 55 60	
gag tgg att gga cgt ttt aat cca tac aat ggt gat act ttc tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tct acc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr	
85 90 95	
aca gcc cac atg gag ctc ctg agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc	336
Thr Ala His Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
100 105 110	
tat ttt tgt gga aga tcg gcg tat tac ttc gat agt ggg ggc tac ttt	384
Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe	
115 120 125	
gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc agc tca gcc tcc acc	432

ES 2 573 115 T3

Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr		
130						135					140						
aag	ggc	cca	agc	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct		480
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser		
145					150					155					160		
ggc	ggc	aca	gcc	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa		528
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu		
				165					170					175			
ccc	gtg	acc	gtg	agc	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac		576
Pro	Val	Thr		180					185					190			
acc	ttc	ccc	gct	gtc	ctg	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc		624
Thr	Phe		195				200					205					
gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc		672
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys		
		210				215					220						
aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aga	gtt	gag		720
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu		
225					230					235				240			
ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccc	tgc	cca	gca	cct		768
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro		
				245					250					255			
gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccc	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag		816
Glu	Leu	Leu		260				265						270			
gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg		864
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val		
		275					280					285					
gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac		912
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp		
		290				295					300						
ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccc	cgg	gag	gag	cag	tac		960
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr		
		305			310					315				320			
aac	agc	acg	tac	cgg	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac		1008
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
				325					330					335			
tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc		1056
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu		
			340					345						350			
cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggc	cag	ccc	cgg		1104
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
		355					360					365					
gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag		1152
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys		
		370				375					380						
aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac		1200
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		

ES 2 573 115 T3

385		390		395		400	
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag							1248
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys							
		405		410		415	
acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc							1296
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser							
		420		425		430	
aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca							1344
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser							
		435		440		445	
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc							1392
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser							
		450		455		460	
ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa							1413
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys							
		465		470			

<210> 20
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Construcción Sintética

10

<400> 20

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp																
1				5					10						15	
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys																
			20					25						30		
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe																
		35					40					45				
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu																
		50				55					60					
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn																
65					70					75						80
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr																
				85					90						95	
Thr Ala His Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val																
			100					105						110		
Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe																
		115					120					125				

ES 2 573 115 T3

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

ES 2 573 115 T3

385		390			395						400				
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
			405						410					415	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
			420						425				430		
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
		435					440					445			
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
	450					455					460				
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
465					470										

- 5 <210> 21
- <211> 41
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Cebador B273HF

- <400> 21
- aaagctgagc gaggttcagc tgcagcagtc tggacctgag c 41

- 15 <210> 22
- <211> 42
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 20 <220>
- <223> Cebador B273HR

- <400> 22
- aaagctgagc tgactgtgag agtggcgcct tggccccagt ag 42

- 25 <210> 23
- <211> 130
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

- 30 <400> 23

ES 2 573 115 T3

Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly His
 20 25 30

His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly Gln
 35 40 45

Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr
 50 55 60

Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg
 65 70 75 80

Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp Ser
 85 90 95

Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val
 100 105 110

Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His Lys
 115 120 125

Glu Ser
 130

5 <210> 24
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador DR5 Ndefw

<400> 24
 gtggcatatg gctctgatca cccaaca 28

15 <210> 25
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador DR5 Xhorv

<400> 25
 cgcctcgagt gattcttgt ggacaca 27

25 <210> 26
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> rsDR5

<400> 26

ES 2 573 115 T3

Met Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala Ala
 1 5 10 15

Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly
 20 25 30

His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly
 35 40 45

Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys
 50 55 60

Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr
 65 70 75 80

Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp
 85 90 95

Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met
 100 105 110

Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His
 115 120 125

Lys Glu Ser Leu Glu His His His His His
 130 135

5 <210> 27
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_L1
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (717)

15 <400> 27

ES 2 573 115 T3

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc 48
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

ggc gca tat ggc gac atc gta atg acc cag tct ccg ctg agt ctt cct 96
 Gly Ala Tyr Gln Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

gtg act cca ggg gag ccc gca agc atc tct tgt cgc agc agt cag tca 144
 Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

ctg gtc cat agc aat ggg aac act tac ctg cat tgg tac ctc caa aaa 192
 Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

cca ggg cag tcc cca cag ctc ttg atc tac aag gtg tcc aat cgg ttc 240
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

agt ggt gtg cct gac cgc ttc tcc gga agt ggc tcc ggg aca gat ttc 288

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

act ctt aag att tca aga gtg gag gca gaa gac gtt gga gtc tat tat 336
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

tgc tca cag agc aca cat gtc ccc tgg act ttc ggt ccc ggc aca aaa 384
 Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

gtc gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc 432
 Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg 480
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac 528
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac 576
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa 624
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag 672
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt 717
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 28
 <211> 239
 <212> PRT

5

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Construcción Sintética

10

<400> 28

ES 2 573 115 T3

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
115 120 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

- 5 <210> 29
- <211> 717
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>

ES 2 573 115 T3

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_L2

<220>

<221 > CDS

<222> (1)..(717)

5

<400> 29

atg	gtg	ctg	cag	acc	cag	gtg	ttc	atc	tcc	ctg	ctg	ctg	tgg	atc	tcc	48	
Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser		
1			5						10					15			
ggc	gca	tat	ggc	gac	gtc	gtc	atg	aca	cag	aca	cct	ctg	agc	ctg	ccc	96	
Gly	Ala	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro		
			20				25				30						
gtg	tct	ctg	ggc	gaa	ccc	gcc	agt	att	tct	tgt	agg	tca	tct	cag	tct	144	
Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser		
		35					40				45						
ctg	gtg	cac	agt	aac	gga	aac	aca	tat	ctc	cat	tgg	tac	ctg	cag	aag	192	
Leu	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys		
	50					55					60						
cca	ggt	cag	tcc	cca	aag	ctc	ctg	atc	tat	aag	gtg	agc	aac	aga	ttc	240	
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe		
65					70					75				80			
tcc	gga	gtg	cct	gat	cga	ttc	agc	ggg	agt	ggg	tca	ggg	acc	gac	ttc	288	
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe		
			85					90						95			
acc	ttg	aag	att	agc	cgg	gtc	gag	gcc	gag	gat	ggt	gga	gtg	tat	ttc	336	
Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Phe		
			100					105						110			
tgt	agc	cag	agt	aca	cac	gtg	ccc	tgg	acc	ttc	gga	cct	ggg	act	aaa	384	
Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys		
		115					120					125					
gtc	gag	att	aaa	cgt	acg	gtg	gcc	gcc	ccc	tcc	gtg	ttc	atc	ttc	ccc	432	
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro		
	130					135					140						
ccc	tcc	gac	gag	cag	ctg	aag	tcc	ggc	acc	gcc	tcc	gtg	gtg	tgc	ctg	480	
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu		
145					150					155				160			
ctg	aat	aac	ttc	tac	ccc	aga	gag	gcc	aag	gtg	cag	tgg	aag	gtg	gac	528	
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp		
			165						170					175			
aac	gcc	ctg	cag	tcc	ggg	aac	tcc	cag	gag	agc	gtg	acc	gag	cag	gac	576	
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp		
			180					185					190				
agc	aag	gac	agc	acc	tac	agc	ctg	agc	agc	acc	ctg	acc	ctg	agc	aaa	624	
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys		
		195					200					205					
gcc	gac	tac	gag	aag	cac	aag	gtg	tac	gcc	tgc	gag	gtg	acc	cac	cag	672	
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln		
	210					215					220						
ggc	ctg	agc	tcc	ccc	gtc	acc	aag	agc	ttc	aac	agg	ggg	gag	tgt		717	
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys			
225					230					235							

10

<210> 30

<211> 239
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Construcción Sintética

<400> 30

ES 2 573 115 T3

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe
 100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210>31
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_L3

5

<220>
<221 > CDS
<222> (1)..(717)
<400>31

ES 2 573 115 T3

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc	48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
1 5 10 15	
ggc gca tat ggc gac gtg gtg atg acg cag act ccg ctg tca ctg ccc	96
Gly Ala Tyr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro	
20 25 30	
gta tct ctg gga gag cct gcc agc atc agc tgc agg agc tct caa tca	144
Val Ser Leu Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	
35 40 45	
ctg gtg cac tct aac ggt aat acc tac ctc cac tgg tat ctc cag aag	192
Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys	
50 55 60	
cca gga caa tcc cca aag ttg ctc ata tat aaa gtg tcc aac cgg ttc	240
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	
65 70 75 80	
tca gga gtc cct gac cgg ttt agc ggt agt ggc tct ggt aca gat ttc	288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
85 90 95	
acc ctg aaa ata tca agg gtt gaa gcg gaa gac gta gga gtg tat ttt	336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe	
100 105 110	
tgc agc cag agc acc cat gtc ccc tgg aca ttt ggg ggc ggc acc aag	384
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys	
115 120 125	
gtc gaa atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc	432
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
130 135 140	
ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg	480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
145 150 155 160	
ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac	528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	
165 170 175	
aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac	576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
180 185 190	
agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa	624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys	
195 200 205	
gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag	672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln	
210 215 220	
ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt	717
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
225 230 235	

<210> 32
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 32

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe
 100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

ES 2 573 115 T3

<210> 33
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H1
 <220>

10

<221 > CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 33

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
gtg ctg agc caa gtt cag ctc gtg cag tcc ggc gcg gag gtt aag aaa	96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cca ggc gca tcc gtt aaa gtg tca tgt aag gcc agc ggg tac tcc ttt	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
35 40 45	
atc ggc tac ttt atg aac tgg gtg cgg cag gcc cct ggt atg ggc ctg	192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Met Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg atg gga cgg ttt aat cca tat aat ggc gat act ttt tac aac	240
Glu Trp Met Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aaa ttt aaa gga agg gtc act ctc aca gtg gat aaa agc act agt	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
acg gct tac atg gaa ctg tcc tcc ctc aga tca gaa gat act gcc gtc	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tac tac tgc gcc cga agt gct tac tat ttc gac agc ggg ggc tac ttt	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe	
115 120 125	
gat tat tgg ggc cag ggg acc ctg gta act gtg agc tca gcc tcc acc	432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	
130 135 140	
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct	480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	
145 150 155 160	
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa	528

15

ES 2 573 115 T3

Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu		
				165					170					175			
ccc	gtg	acc	gtg	agc	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac		576
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His		
			180					185					190				
acc	ttc	ccc	gct	gtc	ctg	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc		624
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser		
		195					200					205					
gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc		672
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys		
	210					215					220						
aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aga	gtt	gag		720
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu		
225					230					235					240		
ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccc	tgc	cca	gca	cct		768
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro		
				245					250					255			
gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccc	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag		816
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys		
			260					265					270				
gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg		864
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val		
		275					280					285					
gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac		912
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp		
	290					295					300						
ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccc	cgg	gag	gag	cag	tac		960
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr		
305					310					315					320		
aac	agc	acg	tac	cgg	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac		1008
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
				325					330					335			
tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc		1056
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu		
			340					345					350				
cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggc	cag	ccc	cgg		1104
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
		355					360					365					
gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag		1152
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys		
	370					375					380						
aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac		1200
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		
385				390					395					400			
atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggc	cag	ccc	gag	aac	aac	tac	aag		1248
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys		
				405				410						415			
acc	acc	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc		1296
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser		

ES 2 573 115 T3

	420	425	430	
aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca				1344
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser	435	440	445	
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc				1392
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	450	455	460	
ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa				1413
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	465	470		

<210> 34
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 34

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1				5					10					15	
Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe
		35					40					45			
Ile	Gly	Tyr	Phe	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Met	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Met	Gly	Arg	Phe	Asn	Pro	Tyr	Asn	Gly	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn
65					70					75					80
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Ser	Gly	Gly	Tyr	Phe
		115					120					125			
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
	130					135					140				
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
145					150					155					160

ES 2 573 115 T3

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

ES 2 573 115 T3

	420	425	430
	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
	435	440	445
	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
	450	455	460
	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	465	470	

<210> 35
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H2

<220>
 <221 > CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 35

5	atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
	Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
	1 5 10 15	
10	gtg ctg agc cag gtc cag ctg gtg cag agt gga gcc gag gta aaa aaa	96
	Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
	20 25 30	
15	cca ggg gct agt gtc aag gtc tcc tgt aag gca tct ggt tac tct ttt	144
	Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
	35 40 45	
	ata gga tac ttc atg aac tgg atg aag cag tct ccc ggt atg tct ctg	192
	Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu	
	50 55 60	
	gag tgg att ggc aga ttc aac ccc tac aac ggg gac act ttt tat aat	240
	Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn	
	65 70 75 80	
	cag aag ttc aaa ggg aaa gcc act ctg acc gtg gac aag tca act tcc	288
	Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
	85 90 95	
	aca gca tac atg gaa ttg tcc tca ctg agg tcc gaa gat acc gcc gtg	336
	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
	100 105 110	
	tac ttc tgc gct cgg agt gct tat tat ttc gat agc gga ggg tat ttt	384
	Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe	
	115 120 125	
	gac tat tgg ggg caa ggg acc ctt gta acc gtg agc tca gcc tcc acc	432
	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	
	130 135 140	

ES 2 573 115 T3

aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct	480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	
145 150 155 160	
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa	528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
165 170 175	
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac	576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	
180 185 190	
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc	624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	
195 200 205	
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc	672
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys	
210 215 220	
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag	720
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu	
225 230 235 240	
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct	768
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	
245 250 255	
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag	816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
260 265 270	
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg	864
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
275 280 285	
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac	912
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
290 295 300	
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac	960
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
305 310 315 320	
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac	1008
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
325 330 335	
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc	1056
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	
340 345 350	
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg	1104
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
355 360 365	
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag	1152
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys	
370 375 380	
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac	1200
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
385 390 395 400	
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag	1248

ES 2 573 115 T3

Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
				405					410					415		
acc	acc	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	1296
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
			420					425					430			
aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggc	aac	gtc	ttc	tca	1344
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
		435				440						445				
tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acc	cag	aag	agc	1392
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	
	450					455					460					
ctc	tcc	ctg	tct	ccc	ggc	aaa										1413
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
465					470											

<210> 36
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 36

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1				5					10					15	
Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe
		35					40					45			
Ile	Gly	Tyr	Phe	Met	Asn	Trp	Met	Lys	Gln	Ser	Pro	Gly	Met	Ser	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Phe	Asn	Pro	Tyr	Asn	Gly	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn
65					70					75					80
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Ser	Gly	Gly	Tyr	Phe
		115					120					125			
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
	130					135					140				

ES 2 573 115 T3

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 37
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 37

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
gtg ctg agc gaa gtg cag ctc gtg caa agc ggc gct gaa gtg aaa aaa	96
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cca gga gcc tca gtc aaa gtg tcc tgt aag gcc tcc ggg tat agc ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
35 40 45	
atc ggc tat ttt atg aac tgg atg aag cag agc ccg ggc aaa agc ctc	192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu	
50 55 60	
gaa tgg atc ggg aga ttc aat cca tac aat ggt gac acc ttt tac aat	240
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aaa ttc aaa ggc aag gcc acg ctg act gta gac aaa tcc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
aca gcc cac atg gaa ttg tct tcc ctg agg tct gag gat acc gcg gtg	336
Thr Ala His Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tac ttt tgt ggc cga agt gcg tat tat ttc gat tca gcc ggg tac ttc	384
Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe	
115 120 125	

ES 2 573 115 T3

gat tac tgg ggt cag ggg acg ctc gtc acc gta agc tca gcc tcc acc	432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	
130 135 140	
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct	480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	
145 150 155 160	
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa	528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
165 170 175	
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac	576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	
180 185 190	
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc	624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	
195 200 205	
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc	672
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys	
210 215 220	
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag	720
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu	
225 230 235 240	
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct	768
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	
245 250 255	
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag	816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
260 265 270	
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg	864
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
275 280 285	
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac	912
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
290 295 300	
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac	960
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
305 310 315 320	
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac	1008
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
325 330 335	
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc	1056
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	
340 345 350	
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg	1104
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
355 360 365	
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag	1152
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys	
370 375 380	

ES 2 573 115 T3

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala His Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125

ES 2 573 115 T3

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
370 375 380

ES 2 573 115 T3

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 39
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H1-1

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 39

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
gtg ctg agc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa	96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct ggc gct tct gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
35 40 45	
atc ggc tac ttc atg aac tgg atg cgg cag gcc cct ggc atg gga ctg	192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Met Gly Leu	
50 55 60	
gaa tgg atg ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac	240
Glu Trp Met Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aaa ttc aag ggc aga gtg acc ctg acc gtg gac aag agc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
acc gcc tac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	

ES 2 573 115 T3

	100		105		110		
tat ttc tgc ggc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc							384
Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe	115		120		125		
gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc							432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	130		135		140		
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct							480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	145		150		155		160
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa							528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu		165		170		175	
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac							576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His		180		185		190	
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc							624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser		195		200		205	
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc							672
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		210		215		220	
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag							720
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu		225		230		235	240
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct							768
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		245		250		255	
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag							816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		260		265		270	
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac							864
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		275		280		285	
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac							912
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		290		295		300	
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac							960
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		305		310		315	320
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac							1008
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		325		330		335	
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc							1056
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		340		345		350	
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg							1104
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		355		360		365	

ES 2 573 115 T3

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag 1152
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac 1200
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag 1248
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc 1296
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca 1344
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc 1392
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa 1413
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 40
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 40

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Met Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

ES 2 573 115 T3

			100							105							110
Tyr	Phe	Cys	Gly	Arg	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Ser	Gly	Gly	Tyr	Phe		
		115					120					125					
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr		
	130					135					140						
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser		
145					150					155					160		
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu		
				165					170					175			
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His		
			180					185					190				
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser		
		195					200					205					
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys		
	210					215					220						
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu		
225					230					235					240		
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro		
				245					250					255			
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys		
			260					265					270				
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val		
		275					280					285					
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp		
	290					295					300						
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr		
305					310					315					320		
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
				325					330					335			
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu		
			340					345					350				
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
		355					360					365					

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210>41
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H2-1

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 41

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
gtg ctg agc gag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa	96
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct gga gcc agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
35 40 45	
atc ggc tac ttc atg aac tgg atg aag cag agc ccc ggc atg agc ctg	192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu	
50 55 60	
gaa tgg atc ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttc aag gga aag gcc acc ctg aca gtg gac aag agc acc agc	288

ES 2 573 115 T3

Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser		
				85					90					95			
acc	gcc	tac	atg	gaa	ctg	agc	agc	ctg	cgg	agc	gag	gat	acc	gcc	gtg		336
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val		
			100					105					110				
tac	ttc	tgc	gcc	aga	agc	gcc	tac	tac	ttc	gac	agc	ggc	ggc	tac	ttc		384
Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Ser	Gly	Gly	Tyr	Phe		
		115					120					125					
gac	tac	tgg	ggc	cag	ggc	acc	ctg	gtg	aca	gtg	agc	tca	gcc	tcc	acc		432
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr		
	130					135					140						
aag	ggc	cca	agc	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct		480
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser		
145				150						155					160		
ggc	ggc	aca	gcc	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa		528
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu		
			165					170						175			
ccc	gtg	acc	gtg	agc	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac		576
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His		
			180					185					190				
acc	ttc	ccc	gct	gtc	ctg	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc		624
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser		
		195				200						205					
gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc		672
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys		
	210					215					220						
aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aga	gtt	gag		720
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu		
225				230						235				240			
ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccc	tgc	cca	gca	cct		768
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro		
			245					250					255				
gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccc	toa	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag		816
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys		
			260				265						270				
gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	egg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg		864
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val		
		275				280						285					
gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac		912
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp		
	290				295						300						
ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccc	egg	gag	gag	cag	tac		960
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr		
305				310						315				320			
aac	agc	acg	tac	egg	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac		1008
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
			325					330					335				
tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc		1056
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu		

ES 2 573 115 T3

	340		345		350		
	cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg						1104
	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg						
	355		360		365		
	gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag						1152
	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys						
	370		375		380		
	aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac						1200
	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp						
	385		390		395		400
	atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag						1248
	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys						
	405		410		415		
	acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc						1296
	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser						
	420		425		430		
	aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca						1344
	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser						
	435		440		445		
	tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc						1392
	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser						
	450		455		460		
	ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa						1413
	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys						
	465		470				

<210> 42
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 42

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1				5					10					15	
Val	Leu	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe
		35					40					45			
Ile	Gly	Tyr	Phe	Met	Asn	Trp	Met	Lys	Gln	Ser	Pro	Gly	Met	Ser	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Phe	Asn	Pro	Tyr	Asn	Gly	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn
65					70					75					80

ES 2 573 115 T3

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

ES 2 573 115 T3

	340		345		350										
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
	355						360					365			
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
	370					375					380				
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
385					390					395					400
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
				405					410					415	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
			420					425					430		
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
			435				440					445			
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
	450					455					460				
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
465					470										

<210> 43
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H2-2

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 43

atg	aaa	cac	ctg	tgg	ttc	ttc	ctc	ctg	ctg	gtg	gca	gct	ccc	aga	tgg	48
Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	
1			5					10					15			
gtg	ctg	agc	cag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggc	gcc	gaa	gtg	aag	aaa	96
Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	
			20					25					30			
cct	gga	gcc	agc	gtg	aag	gtg	tcc	tgc	aag	gcc	agc	ggc	tac	agc	ttc	144
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	
			35				40					45				
atc	ggc	tac	ttc	atg	aac	tgg	atg	aag	cag	agc	ccc	ggc	atg	agc	ctg	192
Ile	Gly	Tyr	Phe	Met	Asn	Trp	Met	Lys	Gln	Ser	Pro	Gly	Met	Ser	Leu	
	50					55					60					

ES 2 573 115 T3

gaa tgg atc ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn	
65 70 75 80	
cag aag ttc aag gga aag gcc acc ctg aca gtg gac aag agc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
acc gcc cac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg	336
Thr Ala His Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tac ttc tgc gcc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe	
115 120 125	
gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc	432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	
130 135 140	
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct	480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	
145 150 155 160	
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa	528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
165 170 175	
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac	576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	
180 185 190	
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc	624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	
195 200 205	
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc	672
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys	
210 215 220	
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag	720
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu	
225 230 235 240	
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct	768
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	
245 250 255	
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag	816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
260 265 270	
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg	864
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
275 280 285	
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac	912
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
290 295 300	
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac	960
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
305 310 315 320	
aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac	1008

ES 2 573 115 T3

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc 1056
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg 1104
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag 1152
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac 1200
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag 1248
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc 1296
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca 1344
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc 1392
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa 1413
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 44
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 44

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
 50 55 60

ES 2 573 115 T3

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala His Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

ES 2 573 115 T3

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 45
 <211> 1413
 <212> ADN

5

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H2-3

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413).

15

<400> 45

ES 2 573 115 T3

atg	aaa	cac	ctg	tgg	ttc	ttc	ctc	ctg	ctg	gtg	gca	gct	ccc	aga	tgg	48
Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	
1			5						10					15		
gtg	ctg	agc	gag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggc	gcc	gaa	gtg	aag	aaa	96
Val	Leu	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	
			20					25					30			
cct	gga	gcc	agc	gtg	aag	gtg	tcc	tgc	aag	gcc	agc	ggc	tac	agc	ttc	144
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	
		35					40					45				

ES 2 573 115 T3

atc ggc tac ttc atg aac tgg atg aag cag agc ccc ggc atg agc ctg Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu 50 55 60	192
gaa tgg atc ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn 65 70 75 80	240
cag aag ttc aag gga aag gcc acc ctg aca gtg gac aag agc acc agc Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser 85 90 95	288
acc gcc cac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg Thr Ala His Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val 100 105 110	336
tac ttc tgc gcc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe 115 120 125	384
gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 130 135 140	432
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 145 150 155 160	480
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 165 170 175	528
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 180 185 190	576
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 195 200 205	624
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 210 215 220	672
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu 225 230 235 240	720
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 245 250 255	768
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 260 265 270	816
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 275 280 285	864
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp 290 295 300	912

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac 960
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac 1008
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc 1056
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg 1104
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag 1152
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac 1200
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag 1248
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc 1296
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca 1344
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc 1392
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa 1413
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 46
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 46

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

ES 2 573 115 T3

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala His Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

ES 2 573 115 T3

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

- <210> 47
- <211> 1413
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H2-4
- <220>
- <221 > CDS
- <222> (1)..(1413)
- 15 <400> 47

ES 2 573 115 T3

atg	aaa	cac	ctg	tgg	ttc	ttc	ctc	ctg	ctg	gtg	gca	gct	ccc	aga	tgg	48
Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	
1			5						10					15		
gtg	ctg	agc	cag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggc	gcc	gaa	gtg	aag	aaa	96
Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	

ES 2 573 115 T3

	20	25	30	
cct gga gcc agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc				144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	35	40	45	
atc ggc tac ttc atg aac tgg atg aag cag agc ccc ggc atg agc ctg				192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu	50	55	60	
gaa tgg atc ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac				240
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn	65	70	75	80
cag aag ttc aag gga aag gcc acc ctg aca gtg gac aag agc acc agc				288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser	85	90	95	
acc gcc tac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg				336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	100	105	110	
tac ttc tgc ggc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc				384
Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe	115	120	125	
gac tac tgg ggc cag gcc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc				432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	130	135	140	
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct				480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	145	150	155	160
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa				528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	165	170	175	
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac				576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	180	185	190	
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc				624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	195	200	205	
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc				672
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys	210	215	220	
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag				720
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu	225	230	235	240
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct				768
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	245	250	255	
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag				816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	260	265	270	
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg				864
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	275	280	285	

ES 2 573 115 T3

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac 912
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac 960
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac 1008
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc 1056
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg 1104
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag 1152
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac 1200
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag 1248
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc 1296
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca 1344
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc 1392
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa 1413
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 48
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 48

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

ES 2 573 115 T3

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 49
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H2-5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 49

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp 1 5 10 15	
gtg ctg agc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa	96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys 20 25 30	
cct gga gcc agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe 35 40 45	
atc ggc tac ttc atg aac tgg atg aag cag agc ccc ggc aag agc ctg	192
Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu 50 55 60	
gaa tgg atc ggc cgg ttc aac ccc tac aac ggc gac acc ttc tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn 65 70 75 80	
cag aag ttc aag gga aag gcc acc ctg aca gtg gac aag agc acc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser 85 90 95	
acc gcc tac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val 100 105 110	
tac ttc tgc ggc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc	384
Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe 115 120 125	
gac tac tgg ggc cag gcc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc	432
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 130 135 140	
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct	480
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 145 150 155 160	
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa	528
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 165 170 175	
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac	576
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 180 185 190	
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc	624
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 195 200 205	
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc	672
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 210 215 220	
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag	720
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu 225 230 235 240	
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct	768
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 245 250 255	
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag	816
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	

ES 2 573 115 T3

	260		265		270		
	gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg						864
	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val						
	275		280		285		
	gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac						912
	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp						
	290		295		300		
	ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac						960
	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr						
	305		310		315		320
	aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac						1008
	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp						
		325		330		335	
	tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc						1056
	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu						
		340		345		350	
	cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg						1104
	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg						
		355		360		365	
	gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag						1152
	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys						
		370		375		380	
	aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac						1200
	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp						
	385		390		395	400	
	atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag						1248
	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys						
		405		410		415	
	acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc						1296
	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser						
		420		425		430	
	aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca						1344
	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser						
		435		440		445	
	tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc						1392
	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser						
		450		455		460	
	ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa						1413
	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys						
	465		470				

<210> 50
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Construcción Sintética

10

<400> 50

ES 2 573 115 T3

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Gly Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

ES 2 573 115 T3

<400>51

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc	48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
1 5 10 15	
ggc gca tat ggc gac atc gta atg acc cag tct ccg ctg agt ctt cct	96
Gly Ala Tyr Gln Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro	
20 25 30	
gtg act cca ggg gag ccc gca agc atc tct tgt cgc agc agt cag tca	144
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	
35 40 45	
ctg gtc cat agc aat gag aac act tac ctg cat tgg tac ctc caa aaa	192
Leu Val His Ser Asn Glu Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys	
50 55 60	
cca ggg cag tcc cca cag ctc ttg atc tac aag gtg tcc aat cgg ttc	240
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	
65 70 75 80	
agt ggt gtg cct gac cgc ttc tcc gga agt ggc tcc ggg aca gat ttc	288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
85 90 95	
act ctt aag att tca aga gtg gag gca gaa gac gtt gga gtc tat tat	336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr	
100 105 110	
tgc tca cag agc aca cat gtc ccc tgg act ttc ggt ccc ggc aca aaa	384
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys	
115 120 125	
gtc gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc	432
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
130 135 140	
ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg	480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
145 150 155 160	
ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac	528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	
165 170 175	
aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac	576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
180 185 190	
agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa	624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys	
195 200 205	
gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag	672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln	
210 215 220	
ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt	717
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
225 230 235	

5 <210> 52
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Construcción Sintética

ES 2 573 115 T3

<400> 52

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Val His Ser Asn Glu Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

ES 2 573 115 T3

<210> 53
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> Cebador L-F1

<400> 53
10 aggtaagctt gctagcgcca ccatggtgct gc 32

<210> 54
<211> 42
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador L-NE-R2
20

<400> 54
ccaatgcagg taagtgttct cattgctatg gaccagtgc tg 42

<210> 55
<211> 42
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador L-NE-F2
30

<400> 55
cagtcactgg tccatagcaa tgagaacact tacctgcatt gg 42

<210> 56
<211> 32
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador L-R1
40

<400> 56
ggatgccacc cgtttaaacg ggcccctaac ac 32
45

<210> 57
<211> 717
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
50

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_L1-NF

<220>
<221 > CDS
55 <222> (1)..(717)

<400> 57

ES 2 573 115 T3

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc	48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
1 5 10 15	
ggc gca tat ggc gac atc gta atg acc cag tct ccg ctg agt ctt cct	96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro	
20 25 30	
gtg act cca ggg gag ccc gca agc atc tct tgt cgc agc agt cag tca	144
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	
35 40 45	
ctg gtc cat agc aat ttc aac act tac ctg cat tgg tac ctc caa aaa	192
Leu Val His Ser Asn Phe Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys	
50 55 60	
cca ggg cag tcc cca cag ctc ttg atc tac aag gtg tcc aat cgg ttc	240
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	
65 70 75 80	
agt ggt gtg cct gac cgc ttc tcc gga agt ggc tcc ggg aca gat ttc	288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
85 90 95	
act ctt aag att tca aga gtg gag gca gaa gac gtt gga gtc tat tat	336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr	
100 105 110	
tgc tca cag agc aca cat gtc ccc tgg act ttc ggt ccc ggc aca aaa	384
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys	
115 120 125	
gtc gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc	432
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
130 135 140	
ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg	480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
145 150 155 160	
ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac	528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	
165 170 175	
aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac	576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
180 185 190	
agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa	624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys	
195 200 205	
gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag	672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln	
210 215 220	
ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt	717
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
225 230 235	

<210> 58
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Construcción Sintética

10

<400> 58

ES 2 573 115 T3

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Val His Ser Asn Phe Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225

230

235

ES 2 573 115 T3

<210> 59
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> Cebador L-NF-R2
<400> 59
10 ccaatgcagg taagtgtga aattgctatg gaccagtgac tg 42
<210> 60
<211> 42
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador L-NF-F2
20 <400> 60
cagtcactgg tccatagcaa ttcaacact tacctgcatt gg 42
<210> 61
<211> 717
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_L1-NK
30 <220>
<221 > CDS
<222> (1)..(717)
35 <400> 61

ES 2 573 115 T3

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc	48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
1 5 10 15	
ggc gca tat ggc gac atc gta atg acc cag tct ccg ctg agt ctt cct	96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro	
20 25 30	
gtg act cca ggg gag ccc gca agc atc tct tgt cgc agc agt cag tca	144
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	
35 40 45	
ctg gtc cat agc aat aag aac act tac ctg cat tgg tac ctc caa aaa	192
Leu Val His Ser Asn Lys Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys	
50 55 60	
cca ggg cag tcc cca cag ctc ttg atc tac aag gtg tcc aat cgg ttc	240
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe	
65 70 75 80	
agt ggt gtg cct gac cgc ttc tcc gga agt ggc tcc ggg aca gat ttc	288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
85 90 95	
act ctt aag att tca aga gtg gag gca gaa gac gtt gga gtc tat tat	336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr	
100 105 110	
tgc tca cag agc aca cat gtc ccc tgg act ttc ggt ccc ggc aca aaa	384
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys	
115 120 125	
gtc gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc	432
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
130 135 140	
ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg	480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
145 150 155 160	
ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac	528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	
165 170 175	
aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac	576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
180 185 190	
agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa	624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys	
195 200 205	
gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag	672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln	
210 215 220	
ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt	717
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
225 230 235	

<210> 62

<211> 239

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

5 <400> 62

Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser
1				5					10					15	
Gly	Ala	Tyr	Gly	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro
			20					25					30		
Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser
		35					40					45			
Leu	Val	His	Ser	Asn	Lys	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys
50						55					60				
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe
65					70					75					80

ES 2 573 115 T3

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

5 <210> 63
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador L-NK-R2

<400> 63
 ccaatgcagg taagtgtct tattgctatg gaccagtgac tg 42

15 <210> 64
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador L-NK-F2

<400> 64
 cagtcactgg tccatagcaa taagaacact tacctgcatt gg 42

25 <210> 65

<211> 717
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_L1-NL

10 <220>
<221 > CDS
<222> (1)..(717)

<400> 65

ES 2 573 115 T3

atg	gtg	ctg	cag	acc	cag	gtg	ttc	atc	tcc	ctg	ctg	ctg	tgg	atc	tcc	48
Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser	
1			5						10					15		
ggc	gca	tat	ggc	gac	atc	gta	atg	acc	cag	tct	ccg	ctg	agt	ctt	cct	96
Gly	Ala	Tyr	Gly	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	
			20					25					30			
gtg	act	cca	ggg	gag	ccc	gca	agc	atc	tct	tgt	cgc	agc	agt	cag	tca	144
Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	
		35					40					45				
ctg	gtc	cat	agc	aat	ctg	aac	act	tac	ctg	cat	tgg	tac	ctc	caa	aaa	192
Leu	Val	His	Ser	Asn	Leu	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	
	50					55					60					
cca	ggg	cag	tcc	cca	cag	ctc	ttg	atc	tac	aag	gtg	tcc	aat	cgg	ttc	240
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	
65					70				75					80		
agt	ggt	gtg	cct	gac	cgc	ttc	tcc	gga	agt	ggc	tcc	ggg	aca	gat	ttc	288
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	
				85				90						95		
act	ctt	aag	att	tca	aga	gtg	gag	gca	gaa	gac	ggt	gga	gtc	tat	tat	336
Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	
			100					105					110			
tgc	tca	cag	agc	aca	cat	gtc	ccc	tgg	act	ttc	ggt	ccc	ggc	aca	aaa	384
Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	
		115					120					125				
gtc	gag	atc	aag	cgt	acg	gtg	gcc	gcc	ccc	tcc	gtg	ttc	atc	ttc	ccc	432
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	
	130					135					140					
ccc	tcc	gac	gag	cag	ctg	aag	tcc	ggc	acc	gcc	tcc	gtg	gtg	tgc	ctg	480
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	
145					150				155					160		
ctg	aat	aac	ttc	tac	ccc	aga	gag	gcc	aag	gtg	cag	tgg	aag	gtg	gac	528
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	
				165					170					175		
aac	gcc	ctg	cag	tcc	ggg	aac	tcc	cag	gag	agc	gtg	acc	gag	cag	gac	576
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	
			180					185					190			
agc	aag	gac	agc	acc	tac	agc	ctg	agc	agc	acc	ctg	acc	ctg	agc	aaa	624
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	
			195					200					205			
gcc	gac	tac	gag	aag	cac	aag	gtg	tac	gcc	tgc	gag	gtg	acc	cac	cag	672
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	
		210				215					220					
ggc	ctg	agc	tcc	ccc	gtc	acc	aag	agc	ttc	aac	agg	ggg	gag	tgt		717
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys		
225					230					235						

<210> 66

<211> 239

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 573 115 T3

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 66

5

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Val His Ser Asn Leu Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
115 120 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

ES 2 573 115 T3

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

5 <210> 67
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador L-NL-R2

<400> 67
 ccaatgcagg taagtgtca gattgctatg gaccagtgac tg 42

15 <210> 68
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador L-NL-F2

<400> 68
 cagtcactgg tccatagcaa tctgaacct tacctgcatt gg 42

25 <210> 69
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica hB273_H2-1-NE

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 69

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

gtg ctg agc gag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa 96
 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

cct gga gcc agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

ES 2 573 115 T3

atc ggc tac ttc atg aac tgg atg aag cag agc ccc ggc atg agc ctg 192
 Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
 50 55 60

gaa tgg atc ggc cgg ttc aac ccc tac aac gag gac acc ttc tac aac 240
 Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Glu Asp Thr Phe Tyr Asn
 65 70 75 80

cag aag ttc aag gga aag gcc acc ctg aca gtg gac aag agc acc agc 288
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

acc gcc tac atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gat acc gcc gtg 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

tac ttc tgc gcc aga agc gcc tac tac ttc gac agc ggc ggc tac ttc 384
 Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
 115 120 125

gac tac tgg ggc cag gcc acc ctg gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc 432
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct 480
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

ggc ggc aca gcc gcc ctg gcc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa 528
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac 576
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc 624
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc 672
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag 720
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct 768
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag 816
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg 864
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac 912
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

ES 2 573 115 T3

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac 960
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac 1008
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc 1056
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg 1104
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag 1152
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac 1200
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag 1248
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

acc acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc 1296
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca 1344
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc 1392
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

ctc tcc ctg tct ccc ggc aaa 1413
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 70
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Construcción Sintética

10

<400> 70

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

ES 2 573 115 T3

Ile Gly Tyr Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Glu Asp Thr Phe Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

ES 2 573 115 T3

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

5 <210>71
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador H-F1

<400>71
 aggtaagctt gctagcgcca ccatgaaaca cc 32

15 <210> 72
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador H-NE-R2

ES 2 573 115 T3

<400> 72
ctgggtgtag aagggtcct cgttgtaggg gttgaaccgg cc 42

5
<210> 73
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10
<220>
<223> Cebador H-NE-F2

<400> 73
ggccggttca acccctacaa cgaggacacc ttctacaacc ag 42

15
<210> 74
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20
<220>
<223> Cebador H-R1

<400> 74
ggatgccacc cgtttaaacg ggcccgatat ctc 33

25
<210> 75
<211> 705
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30
<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de conatumumab

35
<220>
<221 > CDS
<222> (1)..(705)

<400> 75

ES 2 573 115 T3

atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc	48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
1 5 10 15	
ggc gca tat ggc gaa atc gtg ttg aca cag agt ccc ggc act ctt agc	96
Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser	
20 25 30	
ctt agc ccg ggt gaa cgc gcc acc ctg tcc tgc cgc gcc tct cag gga	144
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly	
35 40 45	
atc tct cgc tct tac ctc gcg tgg tac cag cag aaa ccc ggc cag gcc	192
Ile Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala	
50 55 60	
ccc agt ttg ctg ata tac ggt gcc tct agc cga gca act ggc atc cca	240
Pro Ser Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro	
65 70 75 80	
gac cgg ttc tca gga tct ggc tcc ggg act gac ttc act ctg acc atc	288
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile	
85 90 95	
tcc aga ctg gag ccc gag gat ttc gcg gta tat tac tgc cag cag ttc	336
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe	
100 105 110	
ggc agc agt cct tgg acc ttc gga cag ggt act aag gtg gag att aaa	384
Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
115 120 125	
cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc tcc gac gag	432
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
130 135 140	
cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg aat aac ttc	480
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
145 150 155 160	
tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac gcc ctg cag	528
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
165 170 175	
tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc aag gac agc	576
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	
180 185 190	
acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc gac tac gag	624
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	
195 200 205	
aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc ctg agc tcc	672
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	
210 215 220	
ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt	705
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
225 230 235	

<210> 76
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 76

ES 2 573 115 T3

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly
35 40 45

Ile Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Ser Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe
100 105 110

Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

ES 2 573 115 T3

<210> 77
<211> 1413
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de conatumumab

10

<220>
<221 > CDS
<222> (1)..(1413)

<400> 77

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

gtg ctg agc cag gtg cag ctt cag gaa agc ggg ccc ggc ctc gtg aag 96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

15

ES 2 573 115 T3

ccc tcc cag acc ctg tct ctt act tgt aca gtg agc ggt ggc agc att Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile 35 40 45	144
tct tca ggc gat tac ttc tgg agt tgg att cgc caa ctg cct ggt aaa Ser Ser Gly Asp Tyr Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Lys 50 55 60	192
ggg ctg gaa tgg atc ggg cat att cac aat tca gga acc aca tat tat Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile His Asn Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr 65 70 75 80	240
aac cct tca ctg aag agc cgg gta act atc tcc gtt gac act agc aag Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys 85 90 95	288
aaa cag ttc tcc ctc cgg ctg tct tct gtc aca gcc gct gac acc gct Lys Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala 100 105 110	336
ggt tac tac tgt gca aga gat cgg ggt ggc gac tac tat tac ggc atg Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met 115 120 125	384
gat gtt tgg gga cag gga acc acc gta aca gtg agc tca gcc tcc acc Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 130 135 140	432
aag ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 145 150 155 160	480
ggc ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 165 170 175	528
ccc gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 180 185 190	576
acc ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 195 200 205	624
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 210 215 220	672
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu 225 230 235 240	720
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 245 250 255	768
gaa ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 260 265 270	816
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 275 280 285	864
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac	912

Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
290						295					300					
ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccc	cgg	gag	gag	cag	tac	960
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
305					310					315					320	
aac	agc	acg	tac	cgg	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	1008
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
				325					330					335		
tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	1056
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
			340					345					350			
cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggc	cag	ccc	cgg	1104
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
		355					360					365				
gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	1152
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
	370					375					380					
aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	1200
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
385					390					395					400	
atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggc	cag	ccc	gag	aac	aac	tac	aag	1248
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
				405					410					415		
acc	acc	oct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	1296
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
			420					425					430			
aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggc	aac	gtc	ttc	tca	1344
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
		435					440					445				
tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acc	cag	aag	agc	1392
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	
	450					455					460					
ctc	tcc	ctg	tct	ccc	ggc	aaa										1413
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
465					470											

<210> 78
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Construcción Sintética

10

<400> 78

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

ES 2 573 115 T3

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45

Ser Ser Gly Asp Tyr Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile His Asn Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

Lys Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met
 115 120 125

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 79
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 79

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

10

<210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

ES 2 573 115 T3

<400> 80

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

5 <210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 81

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

15 <210> 82
<211> 5
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 82

Gly Tyr Phe Met Asn
1 5

25 <210> 83
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 83

Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

30 Gly

<210> 84
<211> 13
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 84

Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

40 <210> 85
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> CDRL1 de hB273_L1-NE

50 <400> 85

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Glu Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

ES 2 573 115 T3

5
 <210> 86
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDRL1 de hB273 L1-NF

10
 <400> 86

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Phe Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

15
 <210> 87
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20
 <220>
 <223> CDRL1 de hB273_L1-NK

<400> 87

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Lys Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

25
 <210> 88
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30
 <220>
 <223> CDRL1 de hB273 L1-NL

<400> 88

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Leu Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

35
 <210> 89
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40
 <220>
 <223> CDRH2 de hB273_H2-1-NE

45
 <400> 89

Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Glu Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo capaz de unirse a DR5, **caracterizado porque**:

la secuencia de cadena pesada contiene una región variable que tiene CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y la CDRH1 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 82, la CDRH2 comprende cualquiera de una de las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NO: 89 y 83, y la CDRH3 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 84; y

la secuencia de cadena ligera contiene una región variable que tiene CDRL1, CDRL2 y CDRL3, y la CDRL1 comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NO: 87, 85, 86, 88, y 79, la CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 80, y la CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 81, o un fragmento funcional del anticuerpo que tiene actividad de unión antigénica.

2. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo que tiene actividad de unión antigénica de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** contiene una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 20 y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 16.

3. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo que tiene actividad de unión antigénica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

4. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo que tiene actividad de unión antigénica de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado porque** contiene una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 20 y una secuencia de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 16.

5. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo que tiene actividad de unión antigénica de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el anticuerpo está humanizado.

6. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo que tiene actividad de unión antigénica de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** contiene:

(a) una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

a1) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70;

a2) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 42;

a3) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95 % con una secuencia de aminoácidos seleccionada de a1) y a2);

a4) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 99 % con una secuencia de aminoácidos seleccionada de a1) y a2); y

a5) una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución, delección o adición de uno a varios restos de aminoácidos en cualquiera de una de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de a1) y a2); y

(b) una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

b1) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 62;

b2) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 52;

b3) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 58;

b4) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66;

b5) una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28;

b6) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95 % con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de b1) a b5);

b7) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 99 % con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de b1) a b5); y

b8) una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución, delección o adición de uno a varios restos de aminoácidos en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de b1) a b5).

7. El anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo que tiene actividad de unión antigénica de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** contiene: i) una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 62; ii) una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 52; iii) una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 58; iv) una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 42 y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28; v) una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 141 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 134 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66; vi) una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 62; vii) una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 52; viii) una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 58; ix) una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 42 y una secuencia de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 28; o x) una secuencia de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 471 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una secuencia de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 21 a 239 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 66.
8. El fragmento funcional del anticuerpo que tiene actividad de unión antigénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fab' y Fv.
9. Una composición farmacéutica **caracterizada porque** comprende al menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos que tienen actividad de unión antigénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8.
10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizada por** ser una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención del cáncer.
11. Una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención del cáncer, **caracterizada porque** comprende al menos uno de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los anticuerpos que tienen actividad de unión antigénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 y al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, carboplatino, CPT-11 y vinblastina.
12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer tiroideo, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer uterino, melanoma, glioblastoma y cáncer de células sanguíneas.
13. Un anticuerpo o fragmento funcional del mismo que tiene actividad de unión antigénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer.
14. Un anticuerpo o fragmento funcional del mismo que tiene actividad de unión antigénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer, **caracterizado porque** se administra, de manera simultánea o secuencial, el anticuerpo o fragmento funcional que tiene actividad de unión antigénica y al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, carboplatino, CPT-11, vinblastina y 5-FU.
15. Un producto seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, carboplatino, CPT-11, vinblastina y 5-FU para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer **caracterizado porque** se administra, de manera simultánea o secuencial, un anticuerpo o fragmento funcional del mismo que tiene actividad de unión antigénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
16. El anticuerpo o producto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer tiroideo, cáncer de

estómago, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer uterino, melanoma, fibrosarcoma, glioblastoma y cáncer de células sanguíneas.

17. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 6 o 7.

5 18. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado porque** contiene: i) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 19 y una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 15 o ii) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1413 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 19 y una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 717 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 15.

10 19. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado porque** contiene:

(a) un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las siguientes secuencias de nucleótidos:

- 15 a1) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69;
 a2) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 41;
 a3) una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que se hibrida, en condiciones rigurosas, con un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos seleccionada de a1) y a2); y
 20 a4) una secuencia de nucleótidos que incluye una sustitución, delección o adición de uno a varios nucleótidos en una secuencia de nucleótidos seleccionada de a1) y a2); y

(b) un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en las siguientes secuencias de nucleótidos:

- 25 b1) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 61;
 b2) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 51;
 b3) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 57;
 b4) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 65;
 30 b5) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 27;
 b6) una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que se hibrida, en condiciones rigurosas, con un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de b1) a b5); y
 35 b7) una secuencia de nucleótidos que incluye una sustitución, delección o adición de uno a varios nucleótidos en una cualquiera de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de b1) a b5).

20. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 19, **caracterizado porque** contiene:

- 40 i) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 61; ii) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 51; iii) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 57; iv) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 41, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 27; v) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 423 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 402 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 65; vi) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1413 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 717 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 61; vii) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1413 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos

que comprende los nucleótidos 61 a 717 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 51; viii) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1413 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 717 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 57 ix) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1413 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 41, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 717 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 27; o x) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 58 a 1413 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 69, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 61 a 717 de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 65.

21. Un vector que comprende uno cualquiera de los polinucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 20.
22. Una célula hospedadora transformada que comprende uno cualquiera de los polinucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 20, o el vector de acuerdo con la reivindicación 21.
23. Un procedimiento de producción del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 6 o 7, que comprende la etapa de cultivar la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 22 y purificar el anticuerpo del producto cultivado resultante.

Fig. 1

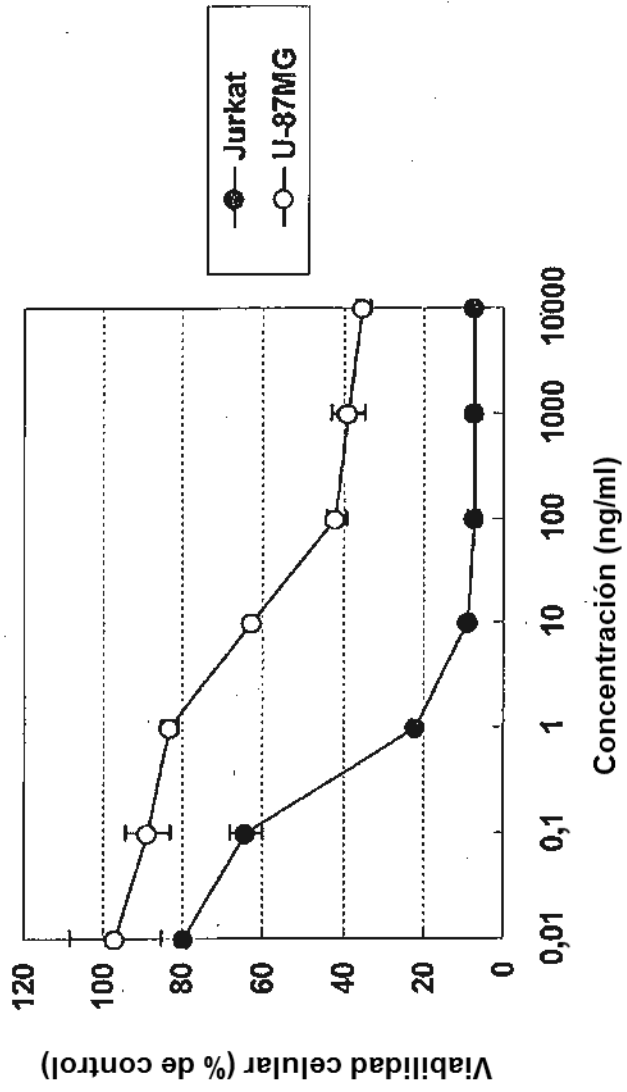


Fig. 2

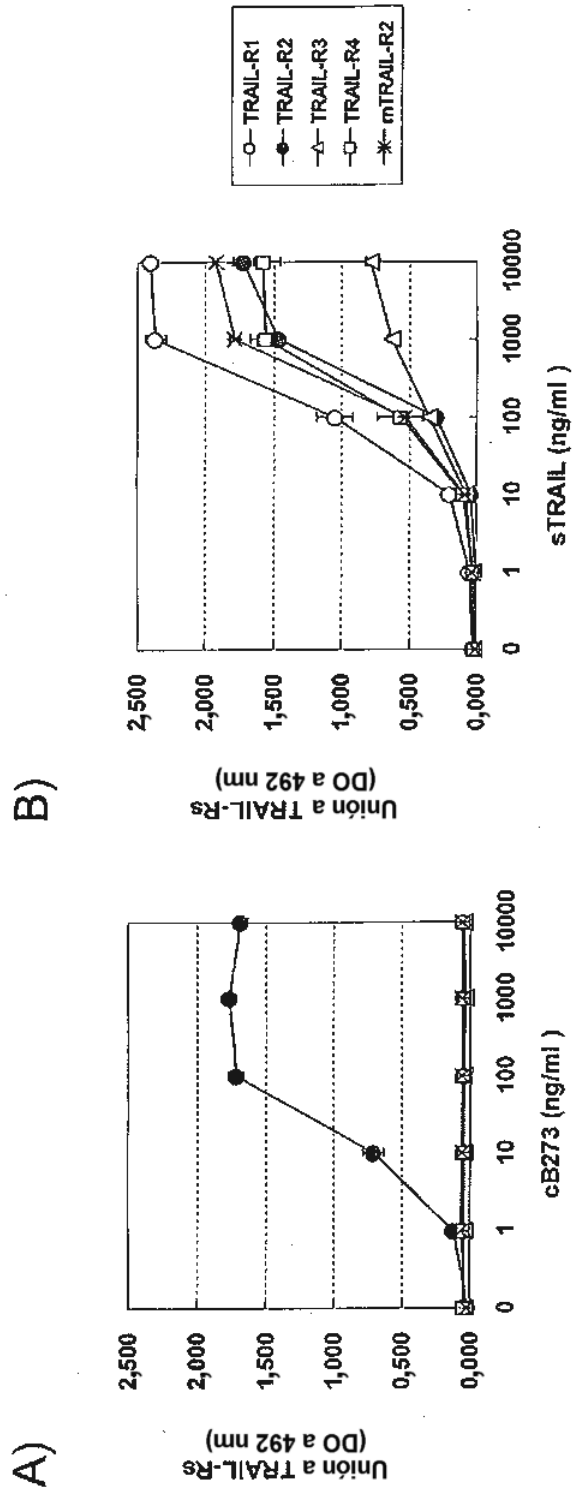
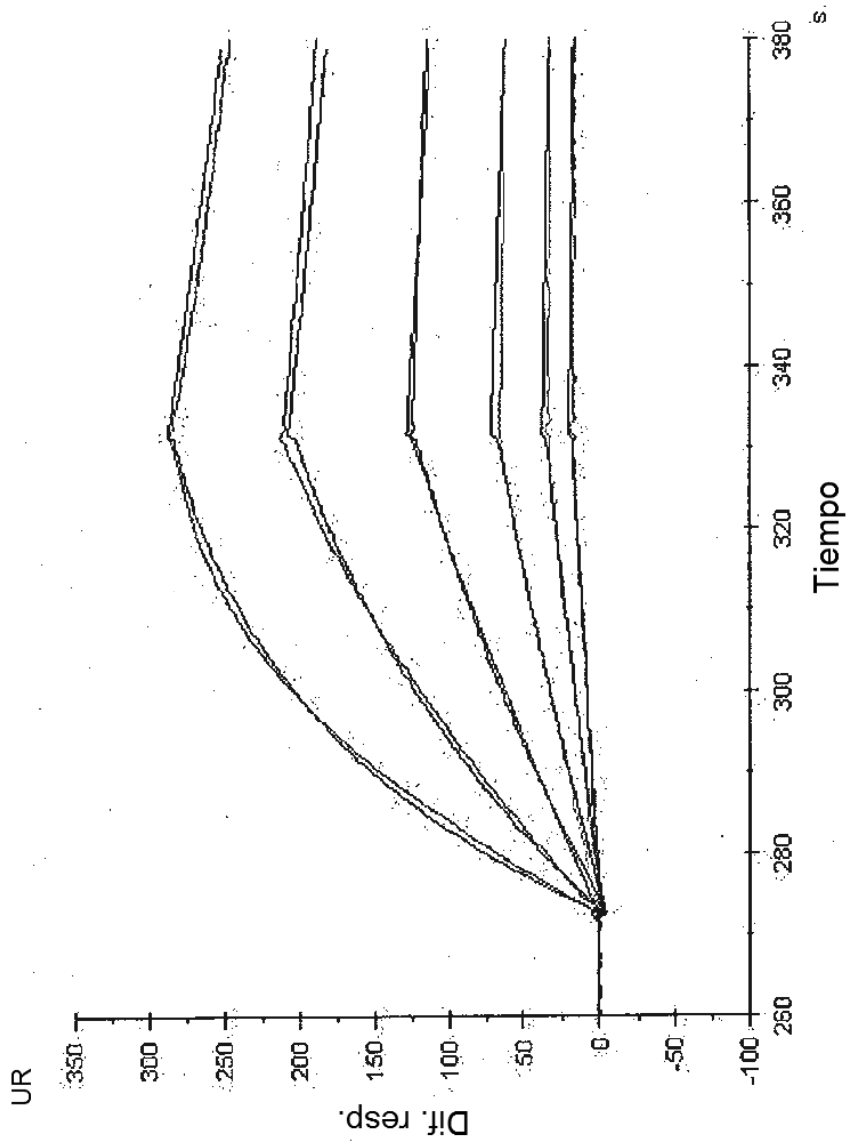


Fig. 3



Kon (1/Ms)	Koff (1/d)	KD (nM)
1,69E+06	2,79E-03	1,65

Fig. 4

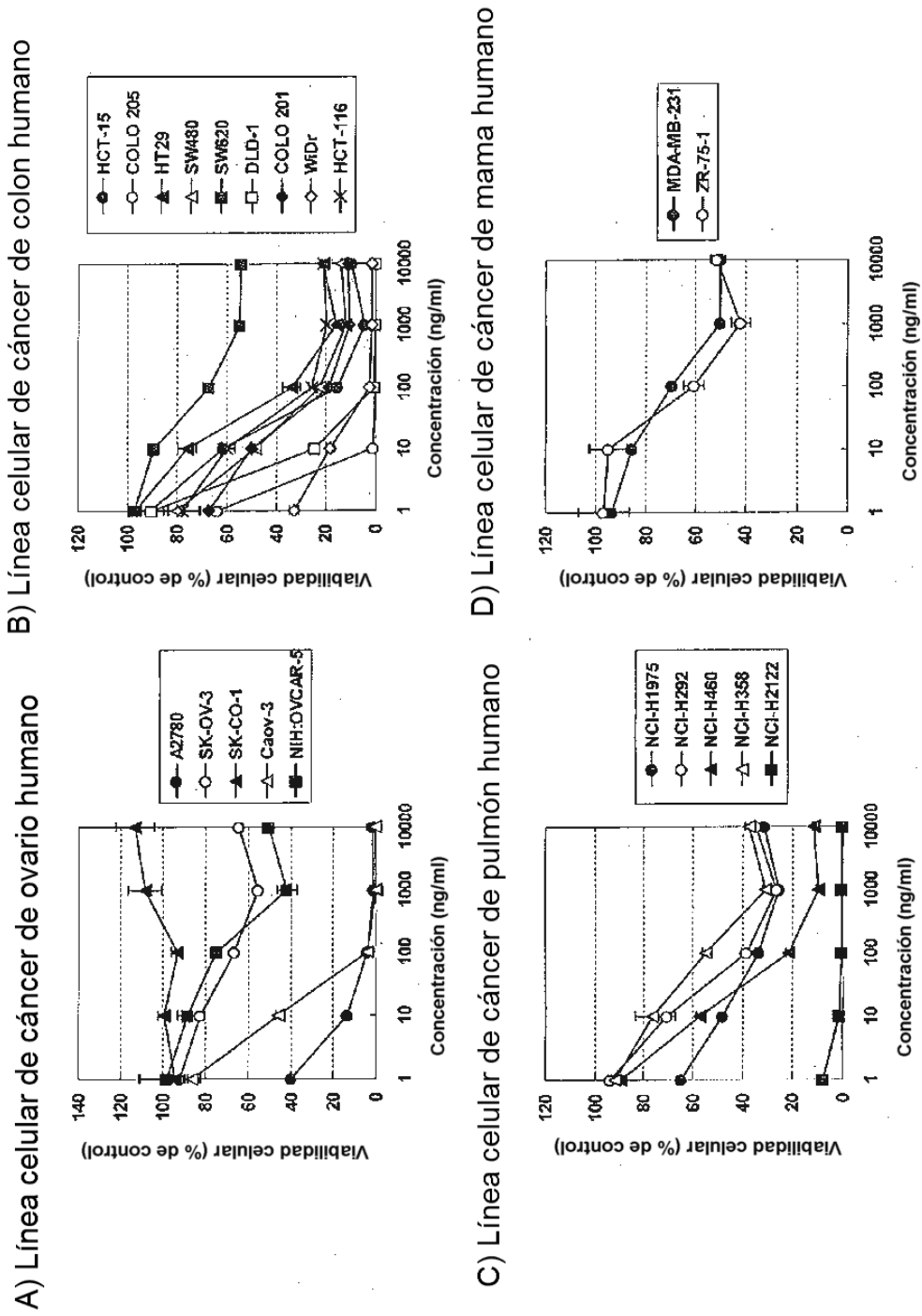
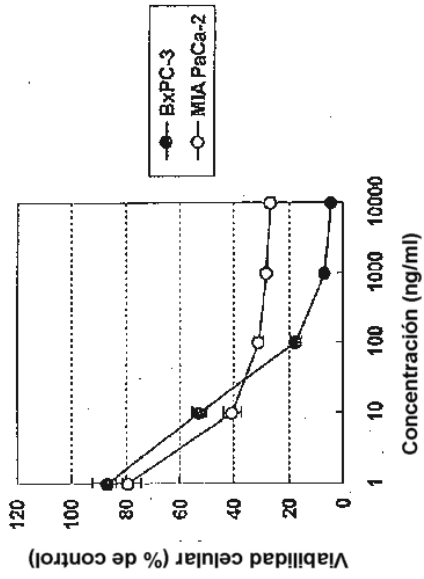
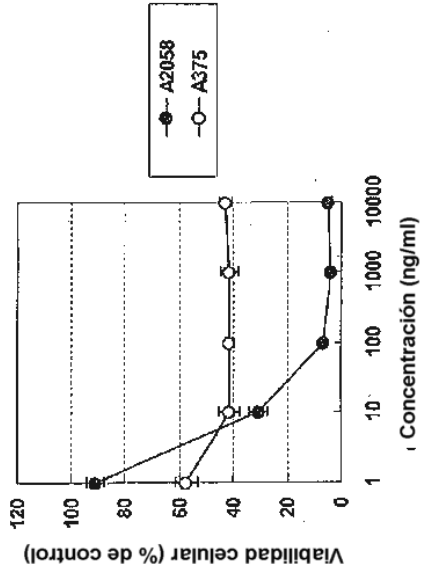


Fig. 5

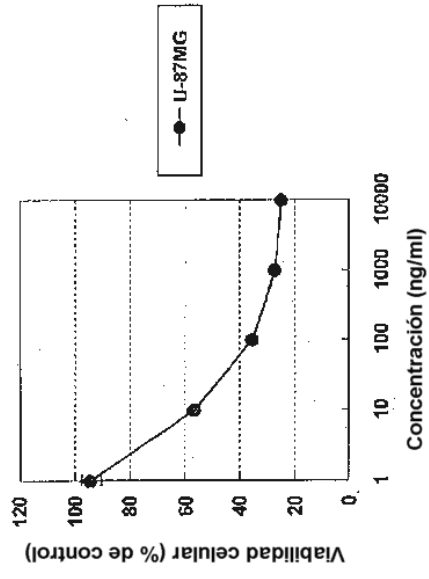
A) Línea celular de cáncer pancreático humano



B) Línea celular de melanoma humano



C) Línea celular de glioblastoma humano



D) Línea celular de cáncer endometrial humano

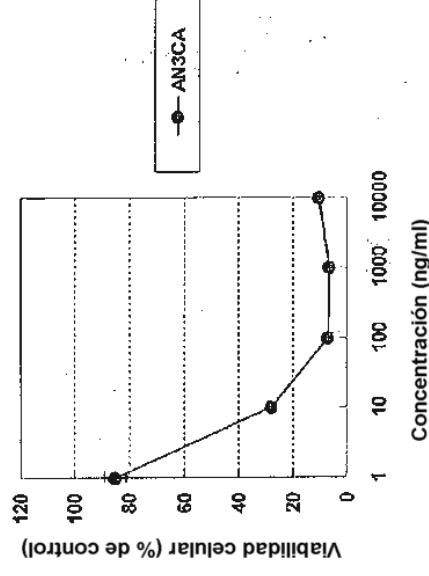


Fig. 6

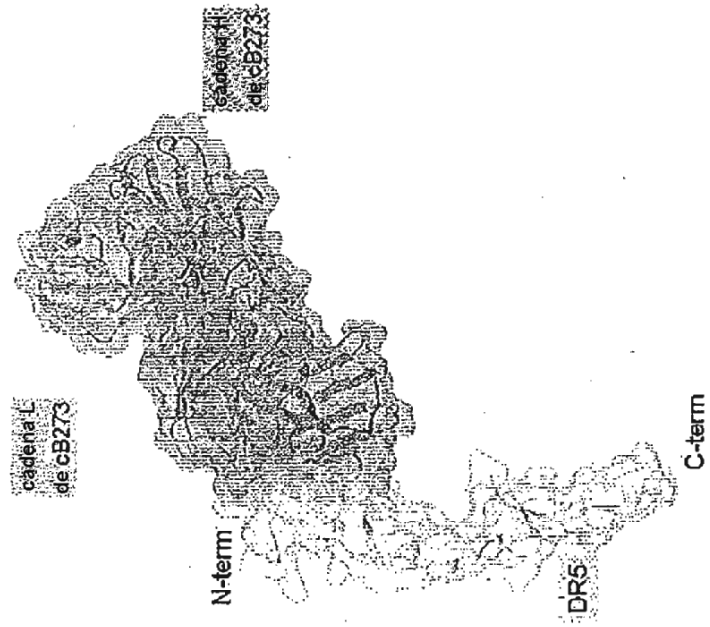
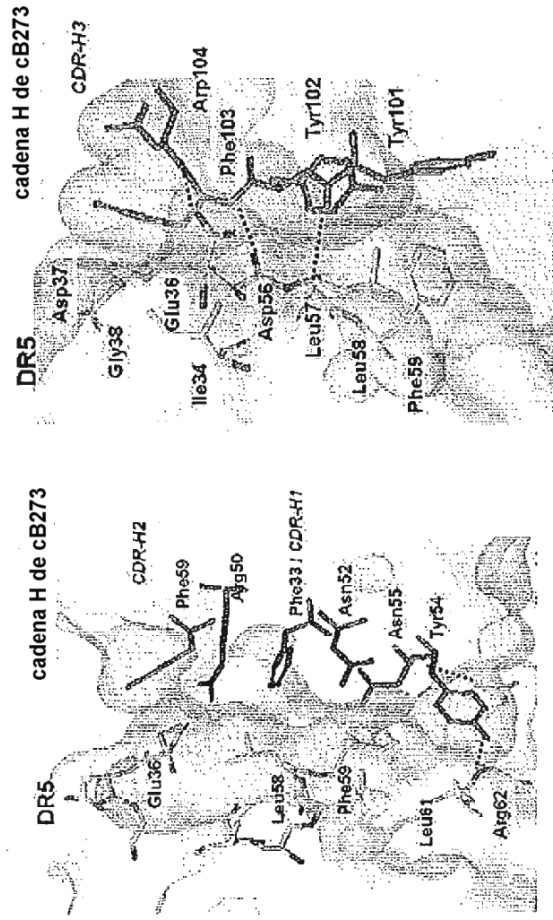


Fig. 7

A)



B)

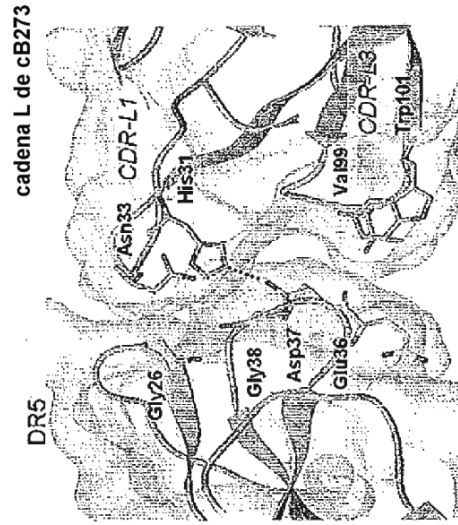


Fig. 8-1

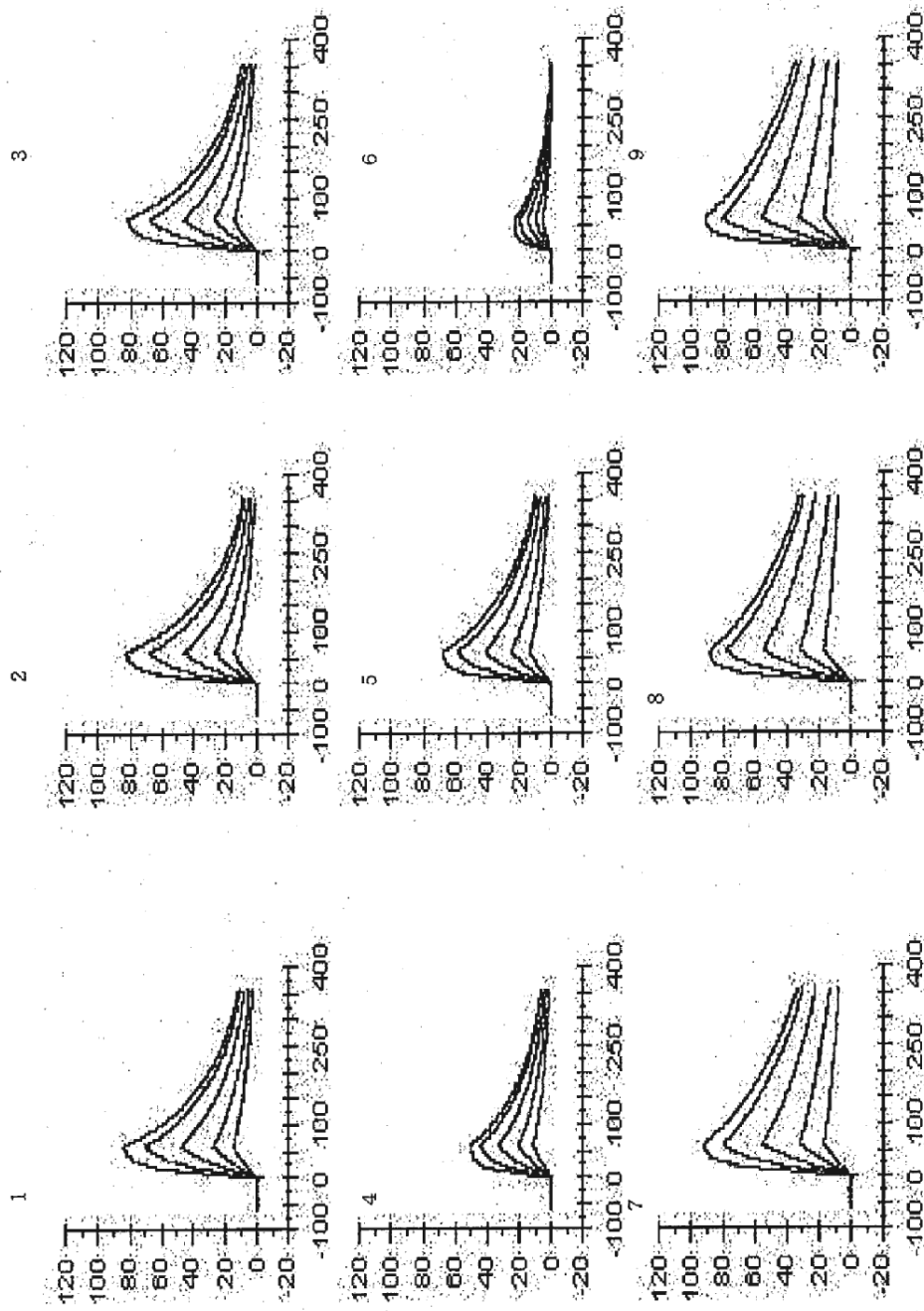


Fig. 8-2

N.º de entrada	Nombre	Kon (l/M _s)	Koff (l/d)	KD (nM)
1	hB273_H1/hB273 L1	1, 804E+06	9, 837E-03	5, 45
2	hB273_H1/hB273 L2	1, 441E+06	9, 409E-03	6, 53
3	hB273_H1/hB273 L3	1, 527E+06	9, 218E-03	6, 04
4	hB273_H2/hB273 L1	1, 853E+06	8, 087E-03	4, 36
5	hB273_H2/hB273 L2	1, 711E+06	7, 694E-03	4, 47
6	hB273_H2/hB273 L3	1, 889E+06	1, 020E-02	5, 40
7	hB273_H3/hB273 L1	1, 809E+06	4, 340E-03	2, 40
8	hB273_H3/hB273 L2	2, 117E+06	4, 645E-03	2, 19
9	hB273_H3/hB273 L3	2, 027E+06	4, 363E-03	2, 15

Fig. 9

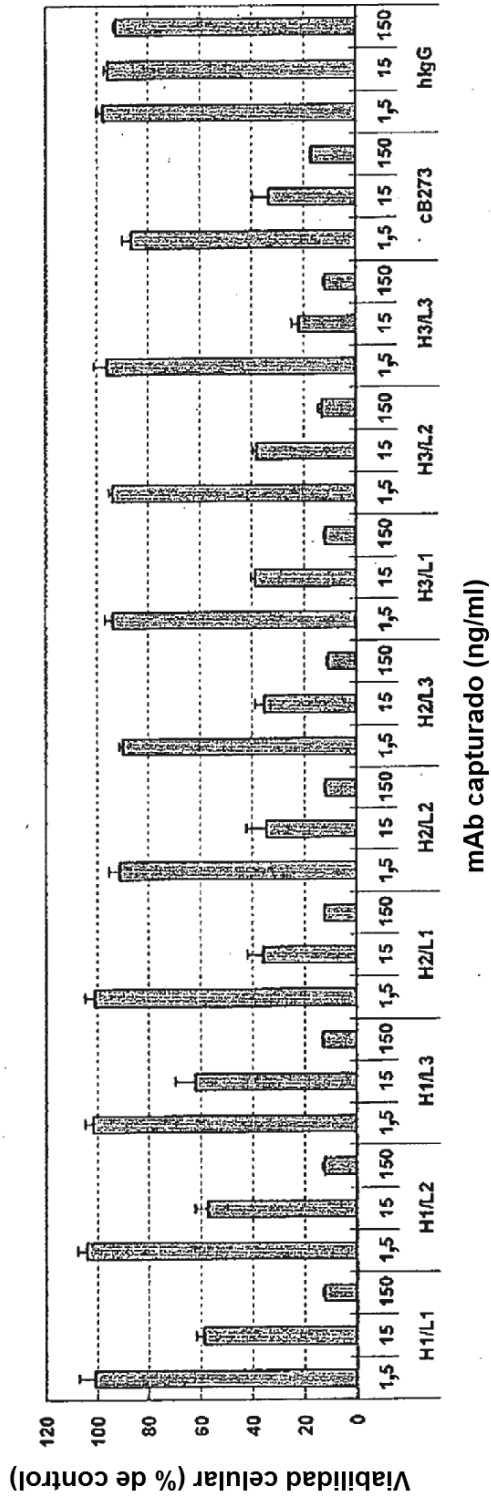


Fig. 10-1

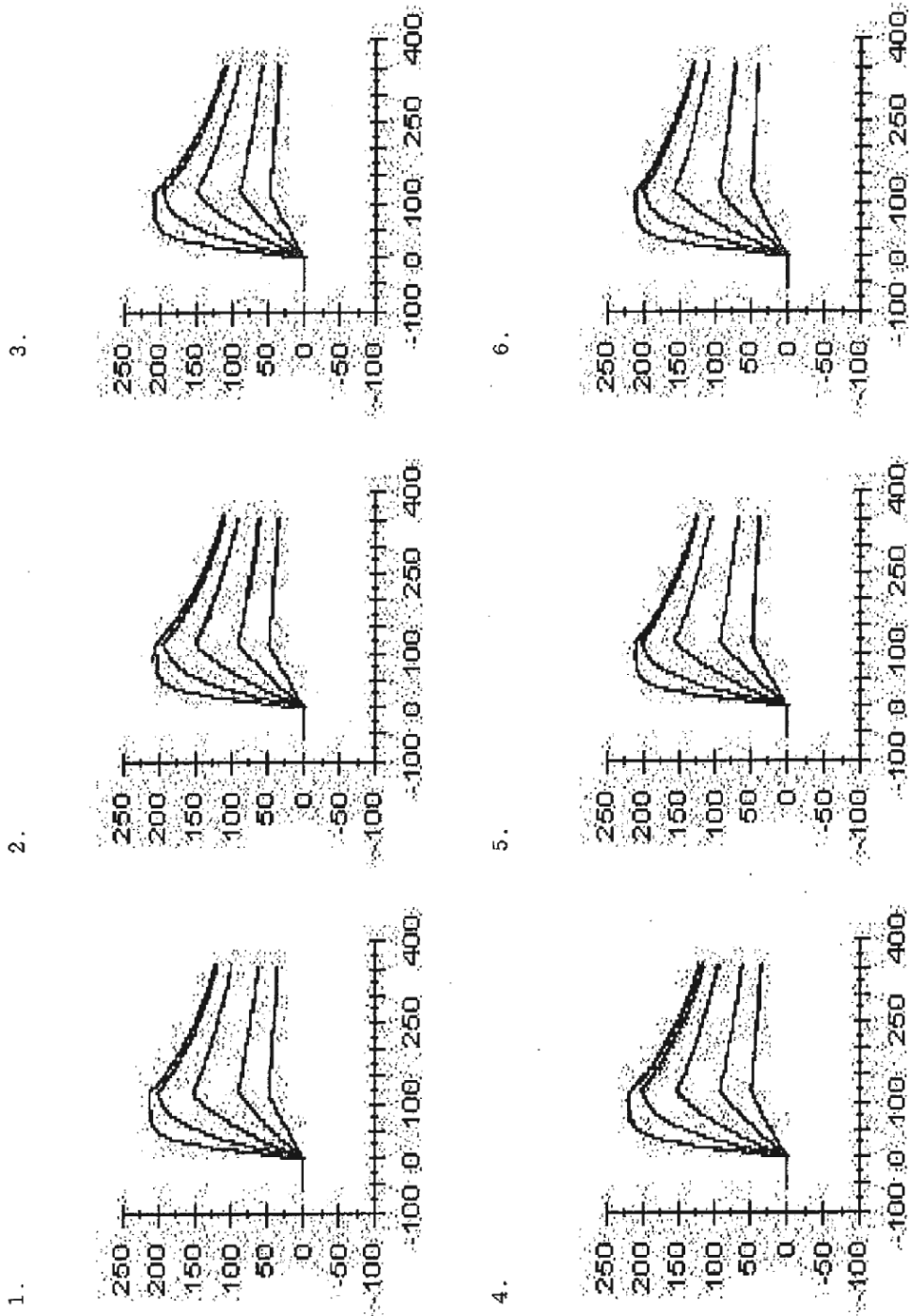


Fig. 10-2

N.º de entrada	Nombre	Kon (1/M _s)	Koff (1/d)	KD (n _M)
1	hB273_H1-1/hB273_L1	2, 074E+06	3, 787E-03	1, 83
2	hB273_H2-1/hB273_L1	2, 014E+06	4, 015E-03	1, 99
3	hB273_H2-2/hB273_L1	2, 036E+06	4, 359E-03	2, 14
4	hB273_H2-3/hB273_L1	1, 770E+06	3, 755E-03	2, 12
5	hB273_H2-4/hB273_L1	2, 327E+06	3, 595E-03	1, 55
6	hB273_H2-5/hB273_L1	2, 196E+06	3, 024E-03	1, 38

Fig. 11

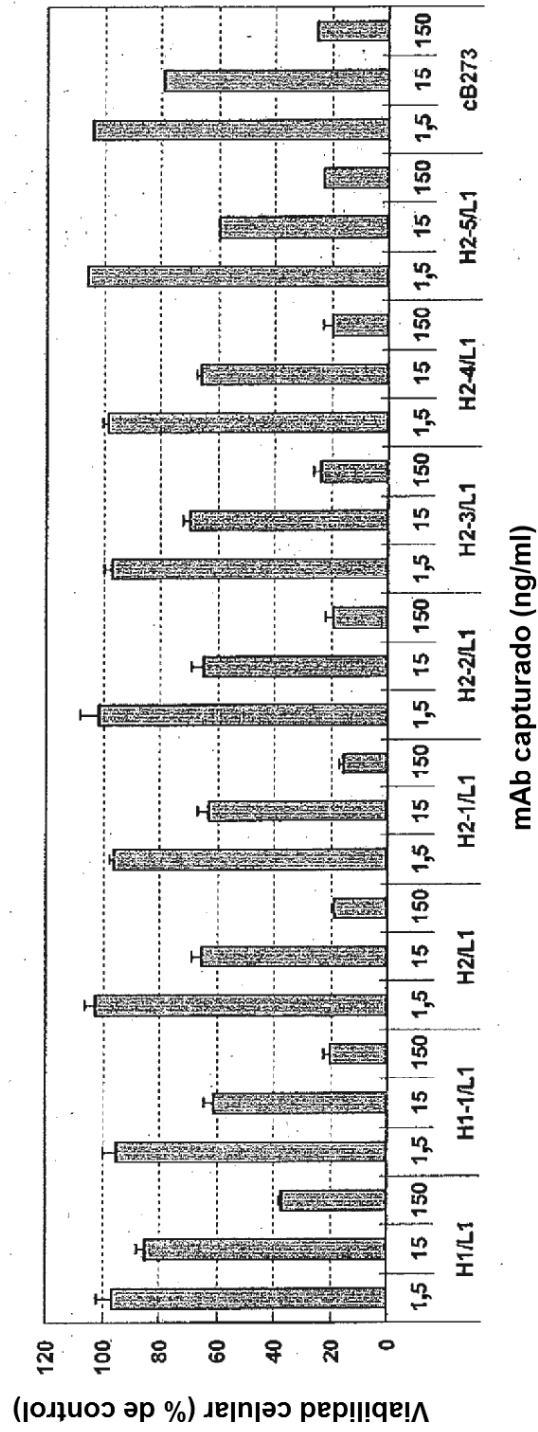


Fig. 12-1

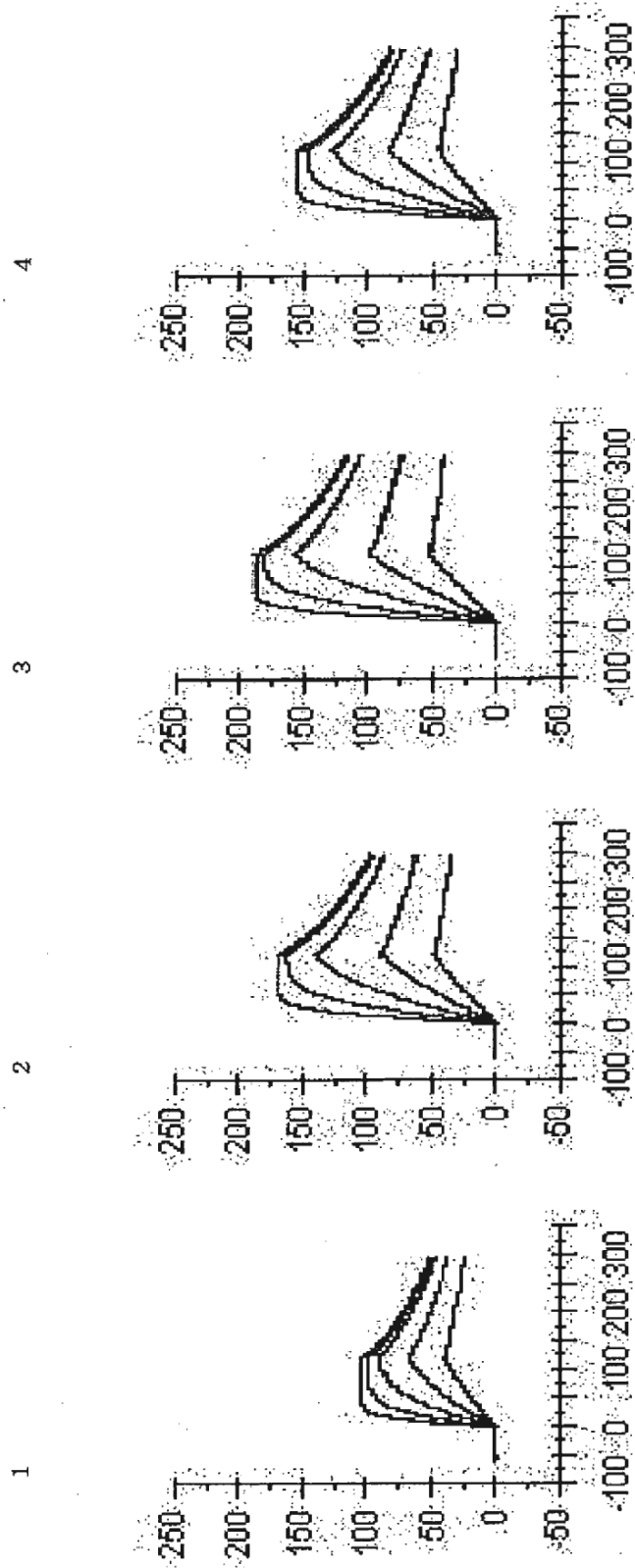


Fig. 12-2

N.º de entrada	Nombre	kon (1/Ms)	kof f (1/d)	KD (nM)
1	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NE	2,77E+06	5,59E-03	2,02
2	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NF	2,92E+06	5,14E-03	1,76
3	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK	3,34E+06	4,63E-03	1,39
4	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NL	3,34E+06	5,90E-03	1,76

Fig. 13-1₁

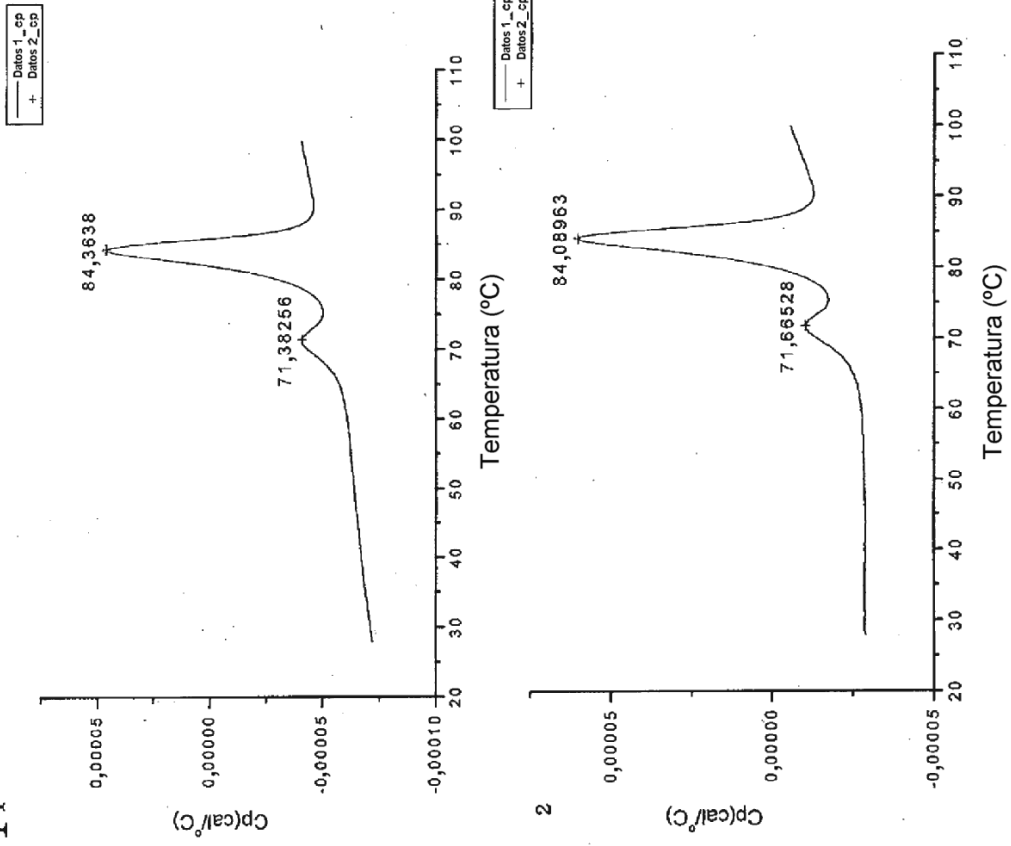


Fig. 13-2₃

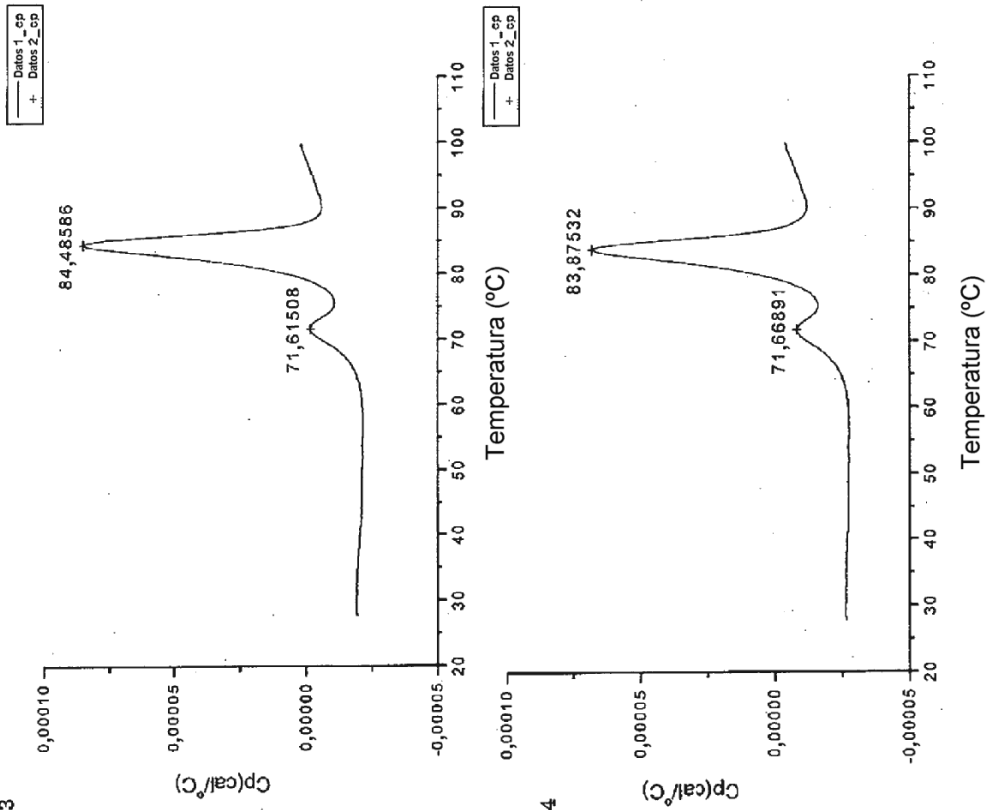


Fig. 13-3

N.º de entrada	Nombre	Tm (°C)
1	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NE	83,9
2	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NF	84,1
3	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NK	84,5
4	hB273_H2-1-NE/hB273_L1-NL	84,4

Fig. 14

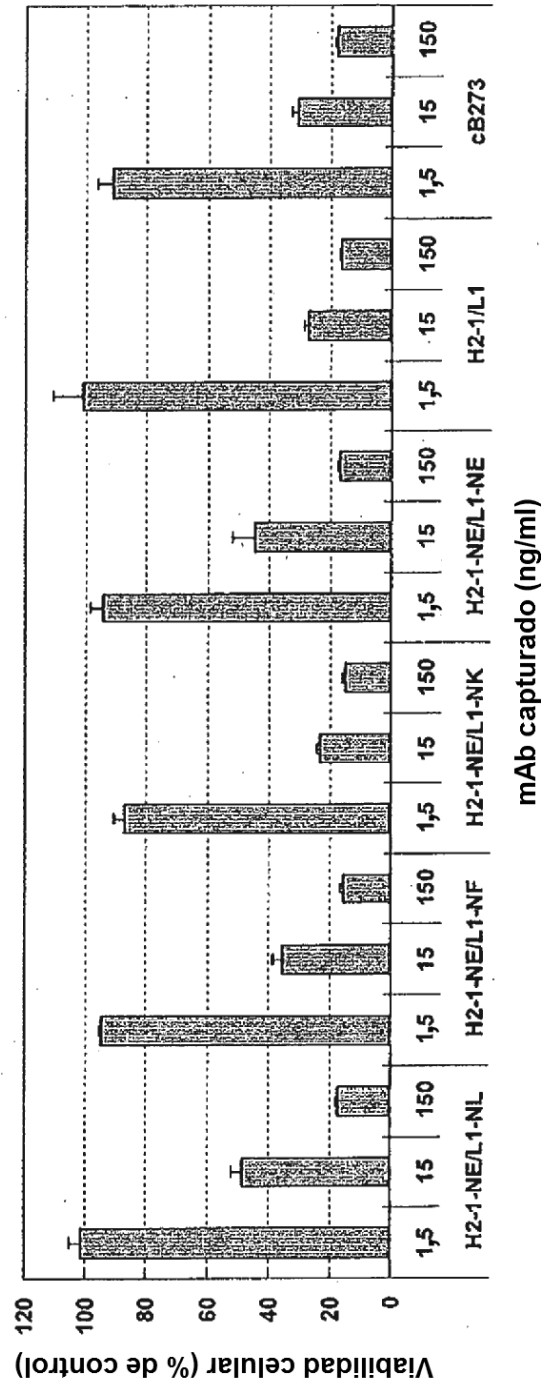
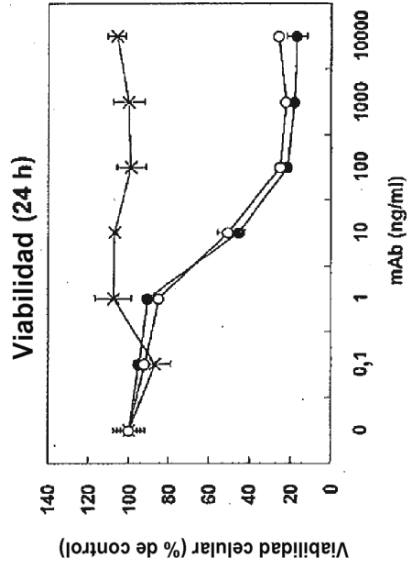
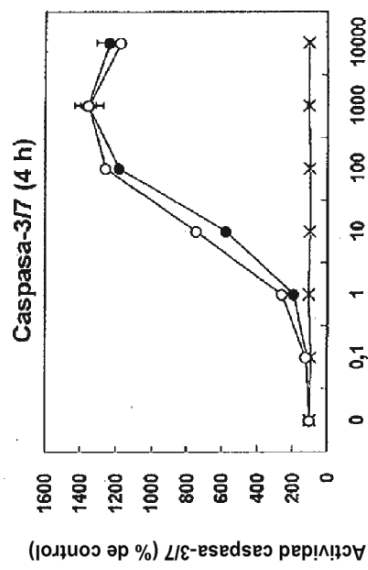


Fig. 15

A) HCT-15



B) U-87MG

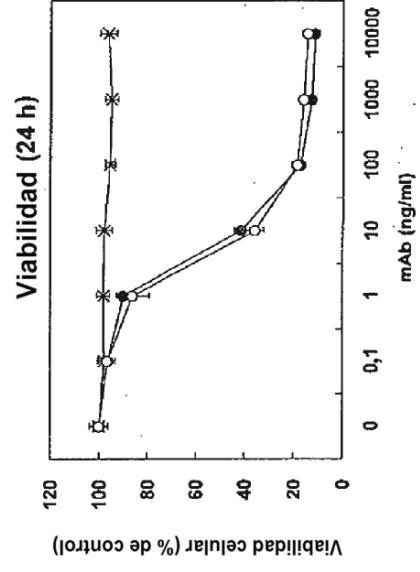
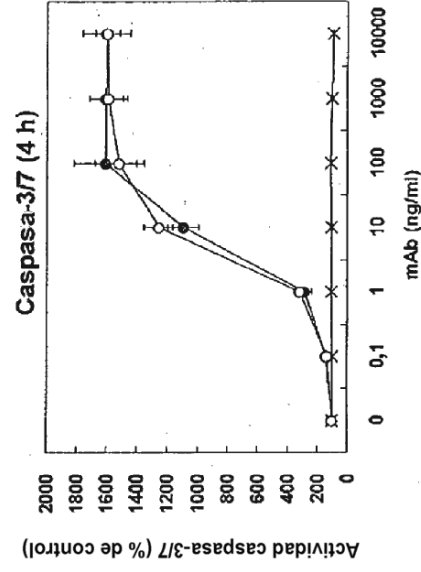
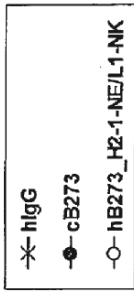


Fig. 16

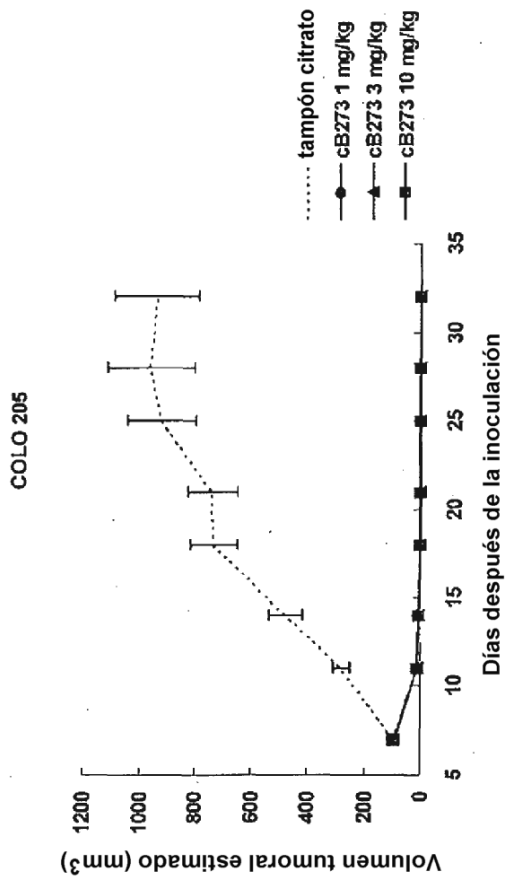


Fig. 17

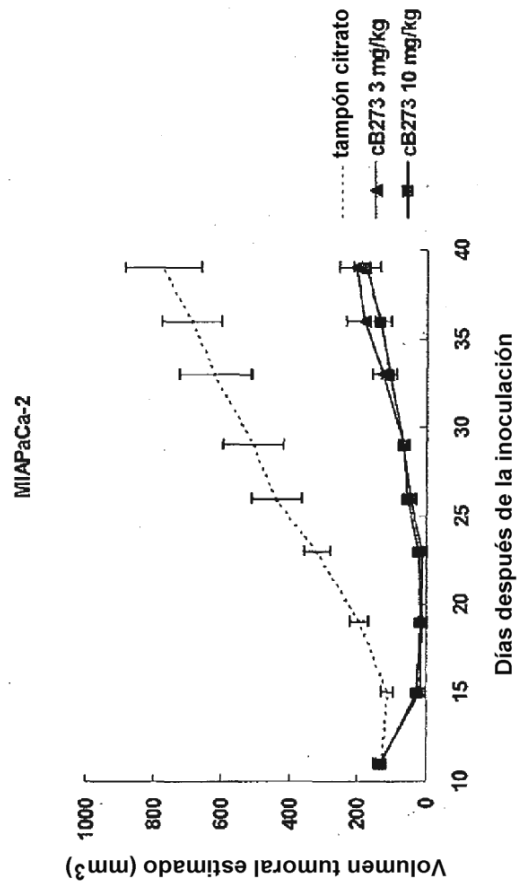


Fig. 18

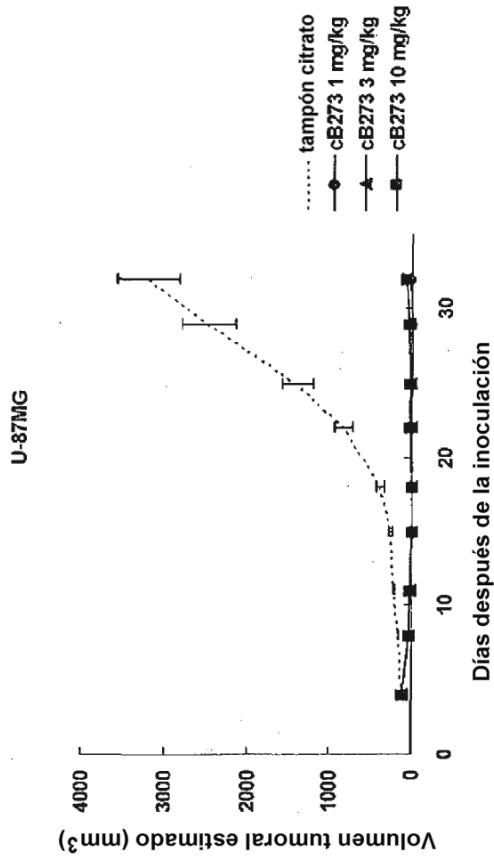


Fig. 19

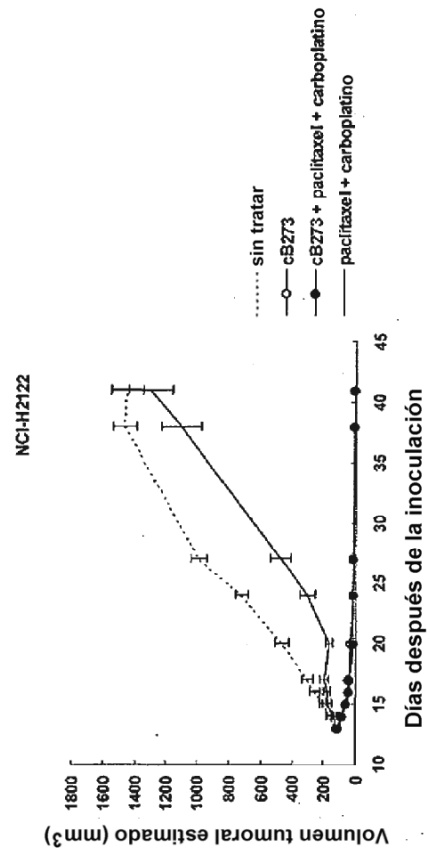


Fig. 20

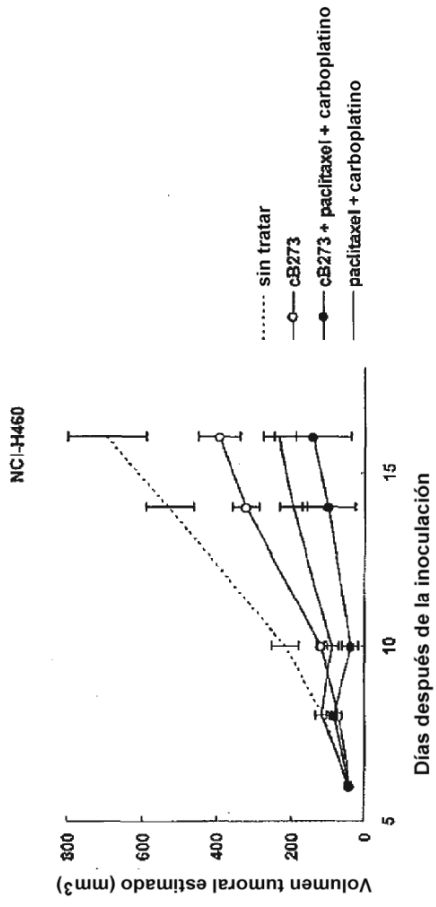


Fig. 21

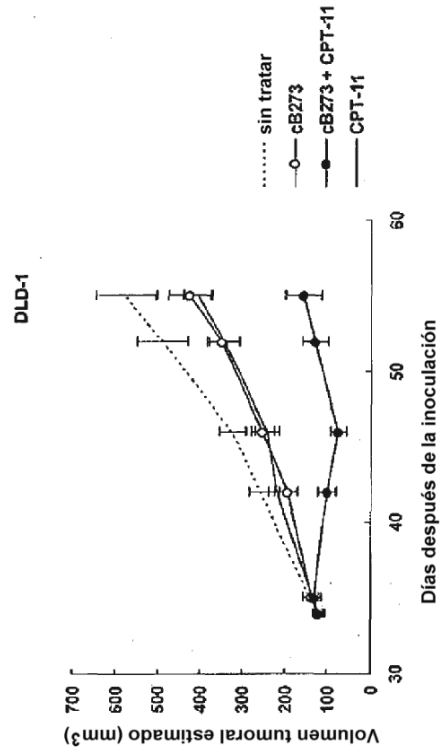


Fig. 22

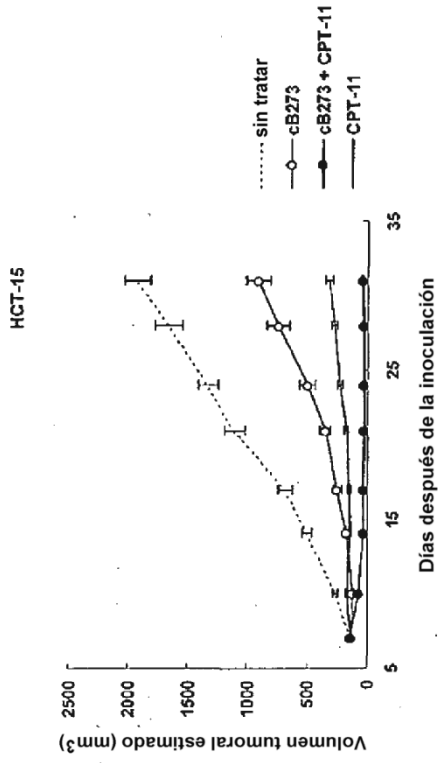


Fig. 23

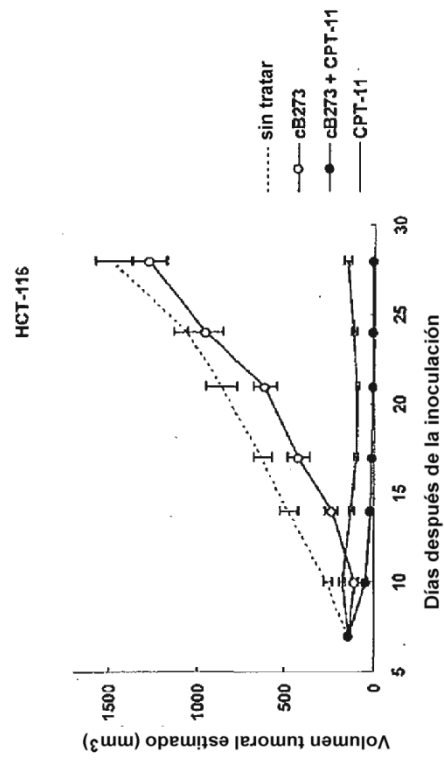


Fig. 24

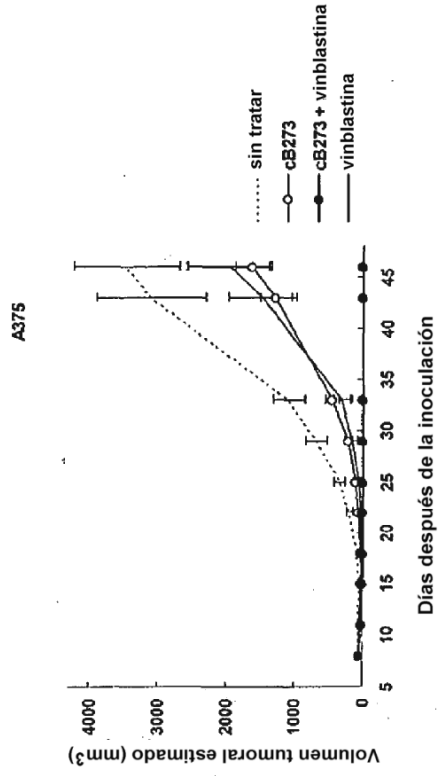


Fig. 25

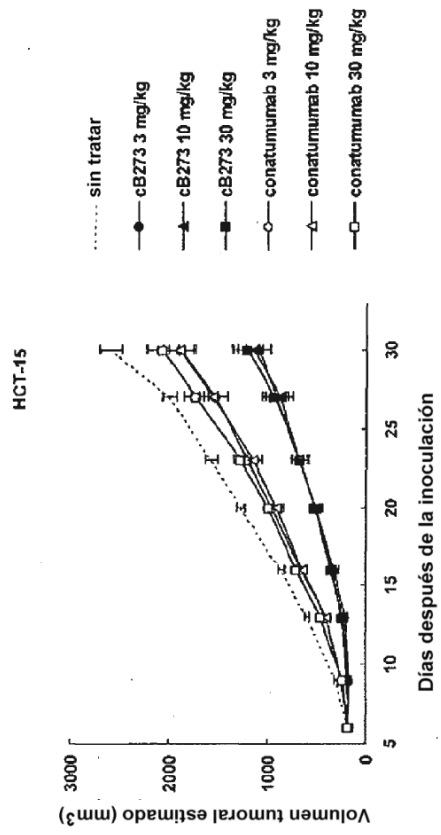


Fig. 26

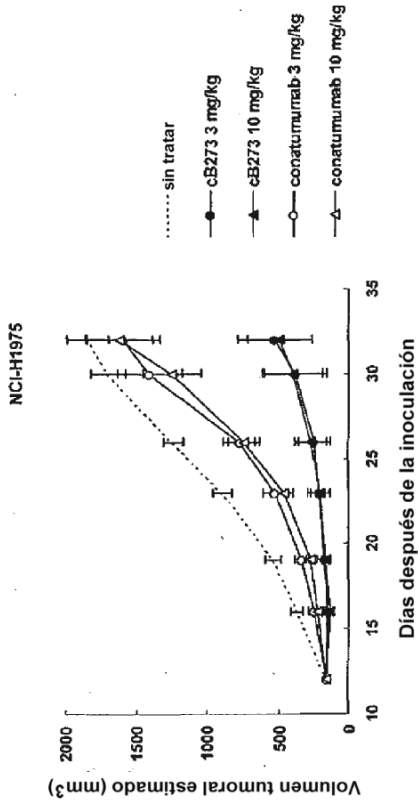


Fig. 27

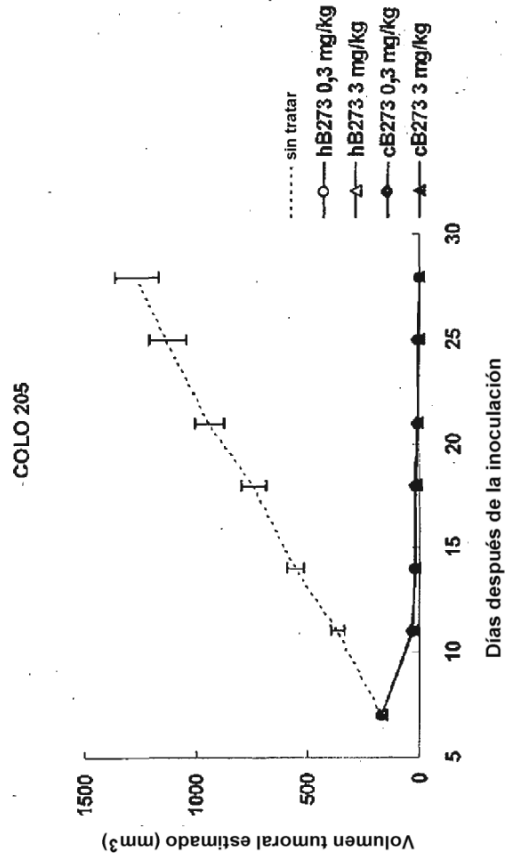


Fig. 28

SEQ ID NO: 7: Secuencia de nucléotidos de ADNc que codifica una cadena pesada del anticuerpo B273 de ratón
 atgggatggagctgtatccttctcttctcctgtcagtaactgttaggtgtgtctctgaggttcagc
 tgcagcagctctggacctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaagatatcctgcaaggcttctgg
 ttactcatttattggctactttatgaactggatgaagcagagccatggaagagccttgagtgatt
 ggacgttttaatccatacaatggtgatactttctacaaccagaagtcaagggcaaggccacattga
 ctgtagacaaatcctctaccacagcccacatggagctcctgagcctgacatctgaggactctgcagt
 ctatcttctgtggaagatcggcgtattactctcgatagtgggggctactttgactactggggccaaggc
 accactctcacagctctcctcagccaaaacgacacccccatctgtctatccactggcccctggatctg
 ctgcccuaactaactccatggtgacctgggatgcctggtaagggtatctccctgagccagtgac
 agtgacctggaactctggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttccagctgtcctgcagctctgac
 ctctacactctgagcagctcagtgactgtcccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgca
 acgttgcccaccggccagcagcaccagggtggacaagaaaattgtgcccagggttggtggtgtaa
 gccttgcatatgtacagtcccagaagtatcatctgtcttcatcttcccccaagcccaaggatgtg
 ctaccattactctgactcctaaggtcacgtgtgttggtgtagacatcagcaaggatgatcccgagg
 tccagttcagctggtttagatgatgtggaggtgcacacagctcagacgcaacccgggaggagca
 gttcaacagcactttccgctcagtcagtgaaacttcccatcatgcaccaggactggctcaatggcaag
 gagttcaaatgcagggtcaacagtcagcttccctgccccatcgagaaaaccatctccaaaacca
 aaggcagaccgaaggctccacaggtgtacaccattccacctcccaaggagcagatggccaaggataa
 agtcagctctgacctgcatgataacagacttcttccctgaagacattactgtggagtgccagtggaat
 gggcagccagcggagaactacaagaactcagcccatcatggacacagatggctcttacttctct
 acagcaagctcaatgtgcagaagagcaactgggaggcaggaaatactttcacctgctctgtgttaca
 tgagggcctgcacaaccaccatactgagaagagcctctcccactctcctggtaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1395)

SEQ ID NO: 8: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo B273 de ratón
 MGWSCIFLFLLSVTVGVFSEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFIGYFMNWMKQSHGKSLEWI
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSTTAHMELLSLTSEDSAVYFCGRSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD
 LYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDV
 LTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGK
 EFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFPEDITVEWQWN
 GQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-465)

Fig. 29

SEQ ID NO: 9: Secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica una cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón
 atgaagttgcctgttaggctgttgggtgctgatgttctggattcctgcttcagcagtgatggtgtga
 tgacccaaactccactctccctgcctgtcagtccttggagatcaagcctccatctcttgcagatctag
 tcagagccttgtacacagtaatggaaacacctatctacattggtacctgcagaagccaggccagtcct
 ccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctgggggccagacaggttcagtgccagtg
 gatcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtgaggctgaggatctgggaatttatttctg
 ctctcaaagtaacatgttccgtggacgttcgggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgggctgat
 gctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagttaacatctggagggtgcctcagtcg
 tgtgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaatgtcaagtggaagattgatggcagtgaaacg
 acaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagc
 accctcacgttgaccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaaga
 catcaacttcacccattgtcaagagcttcaacaggaatgagtg

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-399), Región constante (400-714)

SEQ ID NO: 10: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera del anticuerpo B273 de ratón
 MKLPVRLLVLMFWIPASSDVVMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQS
 PKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKRAD
 AAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKSTYSMS
 TLTLTKDEYERHNSYTCETHKTSTSPIVKSFNRNEC

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-133), Región constante (134-238)

Fig. 30

SEQ ID NO: 15: Secuencia de nucléotidos de una cadena ligera de tipo quimera de B273

atggtgctgcagacccaggtgttcacatccctgctgctgtggatctccggcgcataatggcgatggtg
 tgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtcttgagatcaagcctccatctcttgagatc
 tagtcagagccttgtacacagtaatggaaacacctatctacattggtacctgcagaagccaggccag
 tctccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctgggtcccagacaggttcagtggca
 gtggatcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtggaggctgaggatctgggaatttattt
 ctgctctcaaagtacacatggttccgtggacgttcggtggaggaccaagctggaaatcaaacgtacg
 gtggccgccccctcctggttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgctccg
 tgggtgtgctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccct
 gcagtccgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
 agcaccctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgctgagaggtgacccacc
 agggcctgagctccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtggt

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 16: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo quimera de B273

MVLQTVFISLLLWISGAYGDVVMVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ
 SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGIYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS
 STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 31

SEQ ID NO: 19: Secuencia de nucléotidos de una cadena pesada de tipo quimera de B273

atgaaacacctgtggttcttctcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggttcagc
 tgcagcagctctggacctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaagatatcctgcaaggcttctgg
 ttactcatttatttggctactttatgaactggatgaagcagagccatggaaagagccttgagtggatt
 ggacgttttaatccatacaatggtgatactttctacaaccagaagttcaaggccaaggccacattga
 ctgtagacaaatcctctaccacagcccacatggagctcctgagcctgacatctgaggactctgcagt
 ctatttttgtggaagatcggcgtattacttcgatagtgggggctactttgactactggggccaaggc
 accactctcaagctcagctcagcctccaccaagggccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggcacagccgcccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacccaaggtggacaagagagttagagccaaatctgtgacaa
 aactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagctcttctcttcccc
 ccaaaaoccaaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagac
 aaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgaga
 aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgccccatcccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagccccgagaacaaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 20: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo quimera de B273

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSGFYFMNWMKQSHGKSLEWI
 GRFNPNYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSTTAHMELLSLTSEDSAVYFCGRSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPECPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 32

SEQ ID NO: 27: Secuencia de nucleótidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1

atggtgctgcagaccaggtgttcacatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgacatcg
 taatgaccagctctccgctgagtcttccctgtgactccaggggagcccgcaagcatctcttgtcgag
 cagtcagtcactggtccatagcaatgggaacacttacctgcattggtacctccaaaaaccagggcag
 tccccacagctcttgatctacaaggtgtccaatcgggttcagtggtgtgcctgaccgcttctccggaa
 gtggctccgggacagatttcaactcttaagatttcaagagtggaggcagaagacgcttgaggtctatta
 ttgctcacagagcacacatgtccccctggacttccgggtcccgccacaaaagtcgagatcaagcgtacg
 gtggccgccccctccggtgttcacatcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgctccg
 tgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcct
 gcagtcgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
 agcaccctgaccctgagcaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagaggtgaccacc
 agggcctgagctcccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtgt

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 28: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1

MVLQQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLOKPGQ
 SPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC .

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 33

SEQ ID NO: 29: Secuencia de nucléotidos de una cadena ligera de tipo hB273_L2

atggtgctgcagaccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgacgtcg
 tcatgacacagacacctctgagcctgccctgttctctgggcgaaccgccagtatttctttaggtc
 atctcagtcctctggtgcacagtaacggaaacacatatctccattggtacctgcagaagccaggtcag
 tccccaaagctcctgatctataaggtgagcaacagattctccggagtgcctgatcgattcagcggga
 gtggttcagggaccgacttcaccttgaagattagccgggtcgaggccgaggatggttgagtgattt
 ctgtagccagagtacacacgtgccctggaccttcggacctgggactaaagtcgagattaaacgtacg
 gtggccgccccctccgtgttcattctccccccctccgacgagcagctgaagtcggcaccgcctccg
 tgggtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcct
 gcagtcgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
 agcaccctgaccctgagcaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgaccacc
 agggcctgagctcccccgctcaccaagagcttcaacaggggggagtgt

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 30: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo hB273_L2

MVLQTQVFI SLLLWISGAYGDVVMTQTPLSLPVS LGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ
 SPKLLIYKVS NRFSGV PDRFSGSGS GDTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
 VAAPSVFIFPFSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 34

SEQ ID NO: 31: Secuencia de nucléotidos de una cadena ligera de tipo hB273_L3

atggtgctgcagaccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcataatggcgacgtgg
 tgatgacgcagactccgctgtcactgcccgtatctctgggagagcctgccagcatcagctgcaggag
 ctctcaatcactggtgcactctaacggttaatacctacctcactggtatctccagaagccaggacaa
 tccccaaagtgtgctcatatataaagtgtccaaccggttctcaggagtcctgaccggttagcggtta
 gtggctctggtacagatttcaccctgaaaatatcaagggttgaagcgggaagacgtaggagtgatatt
 ttgcagccagagcaccatgtcccctggacatctggggcgccaccaaggtcgaaatcaagcgtacg
 gtggccgccccctccgtgttcattctccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgctccg
 tgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcct
 gcagtccgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
 agcaccctgacctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgaccacc
 agggcctgagctccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtggt

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 32: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo hB273_L3

MVLQTQVFISLLWISGAYGDVVMQTPLSLPVSLGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYIQKPGQ
 SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDVGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKRT
 VAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS
 STLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 35

SEQ ID NO: 33: Secuencia de nucleótidos de una cadena pesada de tipo hB273_H1

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGctgagcCAAGTTCAGC
 TCGTGCAGTCCGGCGCGGAGGTTAAGAAACCAGGCGCATCCGTTAAAGTGTGTCATGTAAGGCCAGCGG
 GTACTCCTTTATCGGCTACTTTATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGTATGGGCCTGGAGTGGATG
 GGACGGTTTAAATCCATATAATGGCGATACTTTTTACAACCAGAAATTTAAAGGAAGGGTCACTCTCA
 CAGTGGATAAAAGCACTAGTACGGCTTACATGGAACGTCTCCTCCCTCAGATCAGAAGATACTGCCGT
 CTACTACTGCGCCGAAGTGTCTACTATTTGACAGCGGGGGCTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGG
 ACCCTGGTAACTGTGagcTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCA
 AGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGAC
 CGTGAGCTGGAACCTAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTGCAGTCTCA
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
 GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG'TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCTCTTCCCC
 CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
 GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
 AAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGCGTCTCACCGTCTGCACCAG
 GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGA
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTCCCGTGTGGACTCCG
 ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC
 GGCAA

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 34: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H1

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFIGYFMNWVRQAPGMGLEWM
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARSAYYFDGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS
 GLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPFCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 36

SEQ ID NO: 35: Secuencia de nucléotidos una cadena pesada de tipo hB273_H2

atgaaacacctgtggttcttccctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtccagc
 tgggtgcagagtgagcggaggtaaaaaaaccaggggctagtgtaagggtcctctgtaaggcatctgg
 ttactcttttataggatacttcatgaactggatgaagcagctctcccggatgtctctggagtggatt
 ggcagattcaaccctacaacggggacactttttataatcagaagttcaaagggaaagccactctga
 ccgtggacaagtcaacttccacagcatacatggaattgtcctcactgaggtccgaagataccgccgt
 gtacttctgcgctcggagtgttattatttcgatagcggagggtatlttgactattgggggcaaggg
 acccttctaaccgtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcactctggcggcacagccgcctgggctgcctggccaaggactacttccccgaaccctgtgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatcttgtgaaa
 aactcacacatgccaccctgccagcaactgaactcctggggggaccctcagctcttctcttcccc
 ccaaaacccaaggacaccctcatgatctccccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagac
 aaagccccgggaggagcagtaaacagcaactaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaagccctcccagccccatcgaga
 aaaccatctccaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgcccccatcccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggccaaggcttctatcccagcgcacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagccccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal {1-57}, Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 36: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2

MKHLWFFLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFIFYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFNPNYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 37

SEQ ID NO: 37: Secuencia de nucléotidos de una cadena pesada de tipo hB273_H3

atgaaacacctgtggttcttctctctgctgggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaagtgcagc
 tcgtgcaaagcggcgctgaagtgaaaaaccaggagcctcagtcaaaagtgtcctgtaaggcctccgg
 gtatagcttcatcggctattttatgaactggatgaagcagagcccgggcaaaagcctcgaatggatc
 gggagattcaatccatacaatggtgacaccttttacaatcagaaattcaaaggcaaggccacgctga
 ctgtagacaaatccaccagcacagcccacatggaattgtcttccctgaggtctgaggataccgcggt
 gtacttttgtggcogaagtgcgtattatctcagattcaggcgggtacttcgattactggggtcagggg
 acgctcgtcaccgtaagctcagcctccaccaagggccaaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggcacagccgcccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccgctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcaacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaaccaaggtggacaagagagttgagccaaatcttgtgacaa
 aactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagttctctcttcccc
 ccaaaacccaaggacaccctcatgatctccccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtagcgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagac
 aaagccccgggaggagcagtaaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgctcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagcccccatcgaga
 aaaccatctccaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgcacatcgcc
 gtggagtgaggagcaatggccagcccagaaactacaagaccaccctcccgtgctggactcgg
 accgctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggetctgcacaaccactacaccagaagagcctctcctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 38: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H3

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSGYFMNWMKQSPGKSLWEI
 GRFPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAHMELSSLRSEDTAVYFCGRSAIYFDSSGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 38

SEQ ID NO: 39: Secuencia de nucleótidos de una cadena pesada de tipo hB273_H1-1

atgaaacacctgtggttcttctcctcctgctggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagc
 tggcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcttctgtgaagggtgcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggtacttcatgaaactggatgcccagggcccctggcatgggactggaatggatg
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaaattcaagggcagagtgacctga
 ccgtggacaagagcaccagcaccgctacatggaactgagcagcctgcggagcagggataccgccgt
 gtatttctgcggcagaagcgcctactacttgcacagcggcggtacttgcactactggggccagggc
 accctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggcacagcggcctgggctgcctggcgaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggcagcctgcctccagcagcttgggcacccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacccaaggtggacaagagagttagcccaaattctgtgacaa
 aactcacacatgccaccctgccagcactgaaactcctggggggaccctcagcttctcctctcccc
 ccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagc
 aaagccccgggagagcagtaaacagcagcgtaccgggtggcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgaga
 aaaccatctccaaagccaaagccagccccgggaaccacaggtgtacacctgccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggcgaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgaggagcaatggccagcccagaaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 accgctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctcctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 40: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H1-1

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFIGYFMNWMRQAPGMGLEWM
 GRFPYNGDTFYNQKFKGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCGRSAYYFDGGYFDYWQGQ
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPAPPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 39

SEQ ID NO: 41: Secuencia de nucleótidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-1

atgaaacacctgtggttcttctcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcagc
 tggcagctctggcgcgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaagccagcgg
 ctacagcttcatcggctacttcatgaaactggatgaagcagagccccggcatgagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaagttcaagggaaaggccacctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgaggagcaggataccgccgt
 gtacttctgcgccagaagcgcctactacttgcagcagcggcggctacttcgactactggggccagggc
 acctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaacctcctcca
 agagcacctctggcggcacagccgcctgggctgctggtcaaggactacttccccgaacctgtgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggacttactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatcttgtgaaa
 aactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagtcctcctctcccc
 ccaaaaccaaggacacctcatgatctccccgacctgaggtcacatgctggtggtggacgtga
 gccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagac
 aaagccccgggaggagcagtaaacagcagcgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgaga
 aaacctctccaagccaaaggccagccccgggaaccaaggtgtacacctgcccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcagacatgcc
 gtggagtgaggagcaatggccagccccgagaacaactacaagaccacctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctcctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 42: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-1

MKHLWFFLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSGYFIGYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCKDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 40

SEQ ID NO: 43: Secuencia de nucléotidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-2

atgaaacacctgtggttcttccctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagc
 tgggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcacggctacttcatgaactggatgaagcagagccccggcatgagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaagttcaagggaaaggccaccctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcccacatggaactgagcagcctgcgagcagggataccgccgt
 gtacttctgcgccagaagcgcctactacttcgacagcggcggctacttcgactactggggccagggc
 accctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcaccctctggcggcacagccgcccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccogtgc
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgtgtcctgcagctcctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcagcttgggcacccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaatcttgtgacaa
 aactcacacatgcccaccctgcccagcaactgaaactcctggggggaccctcagttcttcttcccc
 ccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagc
 aaagccccgggagagcagtaaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgaga
 aaacatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacccctgccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgaggagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 44: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-2

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSTFIGYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRNFPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAHMELSSLRSEDVAVYFCARSAYYFDGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 41

SEQ ID NO: 45: Secuencia de nucléotidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-3

atgaaacacctgtgggtctctcctcctgctggtagcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcagc
 tggtagcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggctacttcatgaactggatgaagcagagccccggcatgagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaagtcaagggaaaggccacctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcccacatggaactgagcagcctgaggagcgaggataccgccgt
 gtacttctgcgccagaagcgcctacttctgcagcggcggctacttgcactactggggccagggc
 accctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggcacagcccccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagctcctca
 ggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatctgtgacaa
 aactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagctctcctcttcccc
 ccaaaacccaaggacacctcatgatctccccgaccctgaggtcacatgcgtgggtgggagcgtga
 gccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagc
 aaagccccgggaggagcagtaaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgaga
 aaacctctccaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgcccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgaggagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccacctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctcctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 46: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-3

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCRASGYSFIGYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFNPNYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAHMELSSLRSEDVAVYFCARSAYYFDSSGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 42

SEQ ID NO: 47: Secuencia de nucleótidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-4

atgaaacacctgtgggttcttctcctcctgctgggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagc
 tgggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggctacttcatgaaactggatgaagcagagccccggcatgagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaagtcaaggaaaggccaccctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgcccggagcaggataccgcccgt
 gtacttctgcccagaagcgcctactacttgcacagcggcggctacttgcactactggggccagggc
 accctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtctccccctggcaccctcctcca
 agagcacctctggcggcacagccgcctgggctgctgggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccaaatctgtgaaa
 aactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtcctcctcttcccc
 caaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtgggtgggtggacgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcataatgccaagac
 aaagccccgggaggagcagtaaacagcagctaccgggtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgaga
 aaacctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgccccatccccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgacctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgaggagcaatggccagccccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctcctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 48: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-4

MKHLWFFLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTIGYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFNPNYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCGRSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 43

SEQ ID NO: 49: Secuencia de nucléotidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-5

atgaaacacctgtggttcttctcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagc
 tgggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggtacttcatgaactggatgaagcagagccccggcaagagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacggcgacaccttctacaaccagaagtcaagggaaaggccacctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgaggagcagagataccgctg
 gtacttctgaggcagaagcgcctactacttgcagagcggcggctacttgcactactggggccagggc
 acctggtgacagtgagctcagcctccaccaaggggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctcca
 agagcaccctctggcggcacagcggccctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcagggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctca
 ggacttactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttggggcaccagacctacatct
 gcaactggaatcacaagcccagcaaacaccaagggtggacaagagagttgagcccaaatctgtgaaa
 aactcacacatgccaccctgcccagcaccctgaaactcctggggggaccctcagctcttctctcccc
 ccaaaaccaaggaaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagac
 aaagccccgggaggagcagtaaacagcagcgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggtggaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgaga
 aaacctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgcccccatcccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcagacatgcc
 gtggagtgggagagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggtccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 50: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-5

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIGYFMNWMKQSPGKSLEWI
 GRFNPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCGRSAYYFDSGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 44

SEQ ID NO: 51: Secuencia de nucléotidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NE

atgggtgctgcagacccagggtgttcacatctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgacatcg
taatgacccagttctccgctgagttctcctgtgactccaggggagcccgcaagcatctcttgtcgag
cagtcagtcactgggtccatagcaatgagaacacttacctgcattggtacctccaaaaaccagggcag
tccccacagctcttgatctacaagggtgtccaatcgggttcagtggtgtgcctgaccgcttctccggaa
gtggctccgggacagatttcaactcttaagatttcaagagtgaggagcagaagacgcttgaggtctatta
ttgctcacagagcacacatgtcccctggactttcgggtcccggcacaagagtcgagatcaagcgtacg
gtggccgccccctccgtgttcacatctccccccctccgacgagcagctgaagtcgggcaaccgctccg
tggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaagggtgcagtggaaggtggacaacgcctc
gcagtcgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
agcaccctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaagggtgtacgcctgagaggtgacccacc
agggcctgagctcccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtg

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 52: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NE

MVLQTQVFLSLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTPEPASTISCRSSQSLVHSNENTYLHWYLQKPGQ
SPQLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGSCTDFTLKI SRVEAEDVGVYCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
VAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNEYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 45

SEQ ID NO: 57: Secuencia de nucleótidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NF

```
atgggtgctgcagaccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgacatcg
taatgaccagctctccgctgagctcttctctgtgactccaggggagcccgcaagcatctcttgtcgag
cagtcagtcactggtccatagcaatttcaacacttaoctgcattgggtacctccaaaaaccagggcag
tccccacagctcttgatctacaaggtgtccaatcggttcagtggtgctgacctctctccggaa
gtggctccgggacagatttcaactcttaagatttcaagagtgaggcagaagacgttgaggtctatta
ttgctcacagagcacacatgtcccctggactttcgggtcccggcacaagagtcgagatcaagcgtacg
gtggccgccccctccgtgttcattctccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgctccg
tggtgtgctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctc
gcagtcggggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
agcaccctgaccctgagcaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccacc
agggcctgagctccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtg
```

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 58: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NF

```
MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNFNTYLHWYLQKPGQ
SPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCSQSTHVPWTFEGGKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 46

SEQ ID NO: 61: Secuencia de nucleótidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NK

atggtgctgcagaccaggtgttcacatctccctgctgctgtggatctccggcgcataatggcgacatcg
 taatgaccagctctccgctgagtcttcctgtgactccaggggagcccgcaagcalctcttgtcgag
 cagtcagtcactggtccatagcaataagaacacttacctgcattggtacctccaaaaaccagggcag
 tccccacagctcttgatctacaaggtgtccaatcgggttcagtggtgtgcctgaccgcttctccggaa
 gtggctccgggacagatttcactcttaagatttcaagagtgaggcagaagacggttgagctatta
 ttgctcacagagcacacatgtcccctggactttcgggtcccggcacaagagtcagatcaagcgtacg
 gtggccgccccctccgtgttcacatctccccccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgctccg
 tgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcct
 gcagtcgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
 agcaccctgaccctgagcaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagaggtgaccacc
 agggcctgagctcccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtgt

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 62: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NK

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLVHSNKNTYLHWYLQKPGQ
 SPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
 STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 47

SEQ ID NO: 65: Secuencia de nucléotidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NL

atgggtgctgcagaccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgacatcg
 taatgaccagctctccgctgagctcttctgtgactccaggggagcccgcaagcatctctgtcgcag
 cagtcagtcactgggtccatagcaatctgaacacttacctgcattggtacctccaaaaaccagggcag
 tccccacagctcttgatctacaaggtgtccaatcgggttcagtggtgtgcctgacgcttctccggaa
 gtggctccgggacagatttcaactcttaagatttcaagagtggaggcagaagacgcttgaggtctatta
 ttgctcacagagcacacatgtcccctggactttcgggtcccggcacaagagtcgagatcaagcgtacg
 gtggccgccccctccgtgttcattctccccccctccgacgagcagctgaagtcggcaccgctccg
 tgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcct
 gcagtcggggaactcccaggagagcgtgacogagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagc
 agcacctgaccctgagcaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgagaggtgacccacc
 agggcctgagctccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtg

Secuencia señal <1-60), Región variable (61-402), Región constante (403-717)

SEQ ID NO: 66: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de tipo hB273_L1-NL

**MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLVHSNLNTYLHWYLQKPGQ
 SPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCSQSTHVPWTFGPGTKVEIKRT
 VAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLS
 STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-134), Región constante (135-239)

Fig. 48

SEQ ID NO: 69: Secuencia de nucleótidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-1-NE

atgaaacacctgtggttcttctcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcagc
 tgggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggagccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcgg
 ctacagcttcatcggctacttcatgaactggatgaagcagagccccggcatgagcctggaatggatc
 ggccggttcaaccctacaacgaggacaccttctacaaccagaagttcaagggaaaggccaacctga
 cagtggacaagagcaccagcaccgcctacatggaactgagcagcctgctggagcagggataccgctg
 gtacttctgogccagaagcgcctactacttgcacagcggcggctacttgcactactggggccagggc
 acctggtgacagtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcacacctctcca
 agagcacctctggcggcacagccgctgggtgctgctggtcaaggactacttccccgaaccctgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccctgctcctgcagctctca
 ggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaaccagacctacatct
 gcaactggaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaatcttgtgacaa
 aactcacacatgccccacctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagctcttctcttcccc
 ccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
 gccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagac
 aaagccccgggaggagcagtaacaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagccccatcggaga
 aaacctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgcccccatcccggga
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggettctatcccagcgaatcgcc
 gtggagtgaggagcaatggccagcccagagaacaactacaagaccacctcccgtgctggactcgg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgatgaggtctctgcacaaccactacaccagaagagcctctcctctgctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 70: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de tipo hB273_H2-1-NE

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFIGYFMNWMKQSPGMSLEWI
 GRFNPNEDTFYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARSAYYFDSSGGYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 49

SEQ ID NO: 75: Secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica una cadena ligera de conatumumab
 atggtgctgcagaccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcatatggcgaaatcg
 tgttgacacagagtcccggcactcttagccttagcccgggtgaacgcgccaccctgtcctgccgcgc
 ctctcaggggaatctctcgctcttacctcgcgtggtaccagcagaaacccggccaggccccagtttg
 ctgatatacgggtgcctctagccgagcaactggcatcccagaccggttctcaggatctggctccggga
 ctgacttcaactctgaccatctccagactggagcccaggatttcgcggtatattactgccagcagtt
 cggcagcagtccttggaccttcggacagggtaactaaggtggagattaacgtacggtggccgcccc
 tccgtgttcattcttccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgcctgc
 tgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctgcagtcgggaa
 ctcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcaacctgacc
 ctgagcaaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgaccaccagggcctgagct
 cccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtgt

Secuencia señal (1-60), Región variable (61-390), Región constante (400-705)

SEQ ID NO: 76: Secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de conatumumab
 MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWYQQKPGQAPSL
 LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWFQGTQVEIKRTVAAP
 SVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia señal (1-20), Región variable (21-130), Región constante (131-235)

Fig. 50

SEQ ID NO: 77: Secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica una cadena pesada de conatumumab
 atgaaacacctgtggttcttccctcctgctgggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagc
 ttcaggaaagcgggcccggcctcgtgaagccctcccagaccctgtctcttacttgtacagtgagcgg
 tggcagcatttcttcaggcgttacttctggagttggattcgccaactgcctggtaaagggctggaa
 tggatcgggcatattcacaattcaggaaccacatattataacccttcaactgaagagccgggtaacta
 tctccgttgacactagcaagaaacagttctccctccggtgtcttctgtcacagccgctgacaccgc
 tgtttactactgtgcaagagatcgggggtggcgactactattacggcatggatgttggggacagggg
 accaccgtaacagtgagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcacccctcctcca
 agagcacctctggcggcacagccgcccctgggctgcctggtaaggactacttccccgaaccctgtgac
 cgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagctcctca
 ggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaaccagacctacatct
 gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccaaatcttgtgacaa
 aactcacacatgccaccctgccagcactgaactcctggggggaccctcagctcttctcttcccc
 ccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtggggcgtga
 gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtaactggacggcgtggaggtgcataatgccaaagc
 aaagccccgggaggagcagtaaacagcaactaccgggtggtaagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctctccaacaagccctcccagccccatcgaga
 aaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctgccccatccccggg
 ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtaaaaggcttctatcccagcgcacatcgcc
 gtggagtgaggagcaatggccagccccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtctt
 ctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctccc
 ggcaaa

Secuencia señal (1-57), Región variable (58-423), Región constante (424-1413)

SEQ ID NO: 78: Secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de conatumumab
 MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYFWSWIRQLPGKGLE
 WIGHIHNSGTTYNPSLKRVTISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYGGMDVWGQG
 TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

Secuencia señal (1-19), Región variable (20-141), Región constante (142-471)

Fig. 51

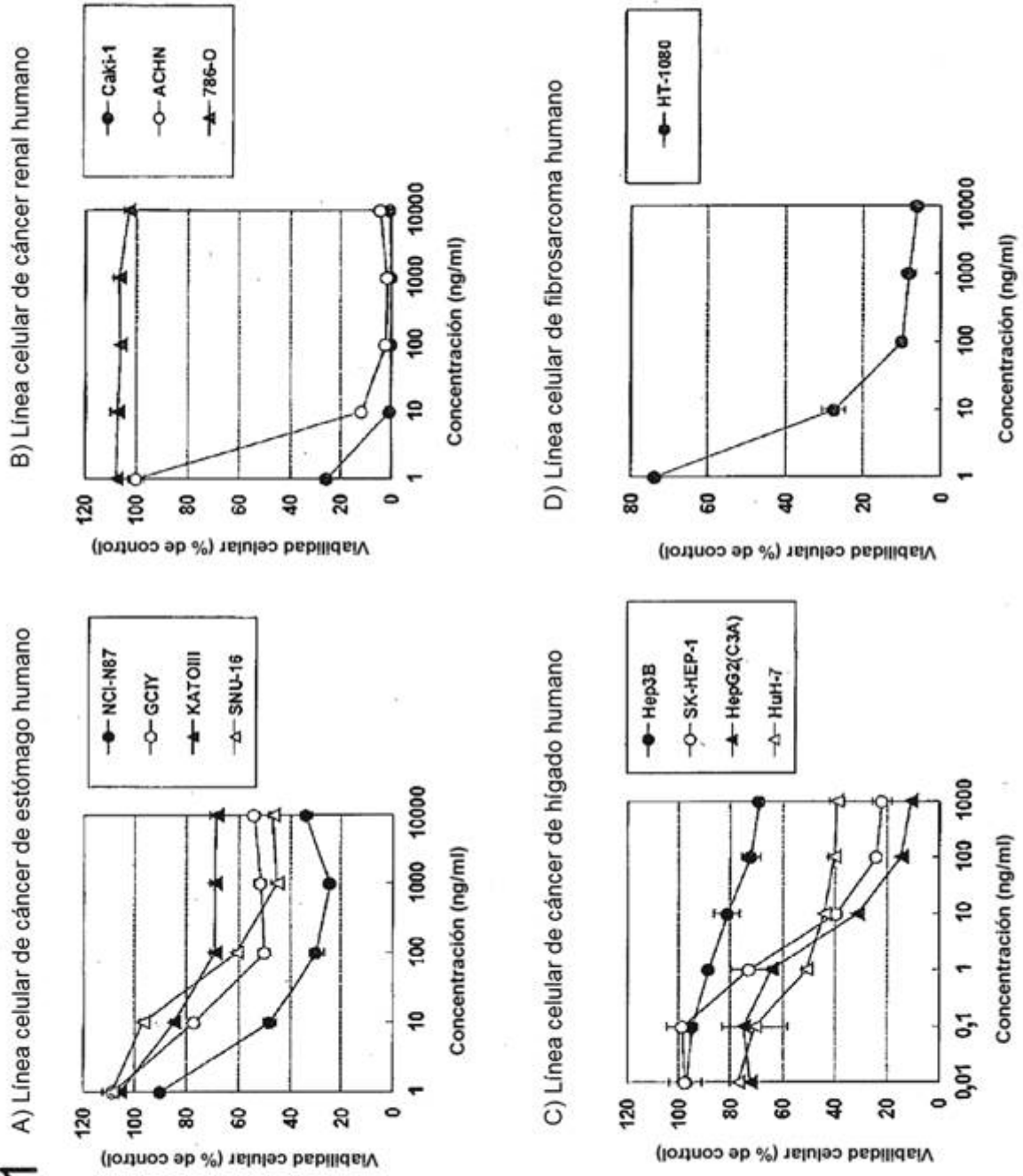


Fig. 52

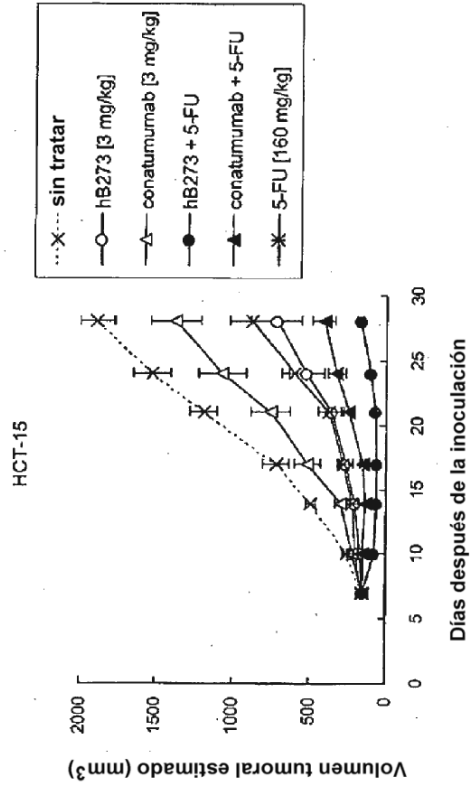


Fig. 53

